ESTUDIO TEORICO-EXPERIMENTAL EN LA BUSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE PEQUEÑO TAMAÑO MOLECULAR DE ESFINGOSINA QUINASA 1 (SphK1)

Tesis para optar al grado de Doctora en Bioquímica

Doctorando: Bioquímica Marcela C. Vettorazzi

Asesor: Dr. Ricardo Daniel Enriz

Co-Asesor: Dr. Sergio Álvarez

Universidad Nacional de San Luis

San Luis

2019

Agradecimientos

Quiero agradecer:

Al estado argentino por apoyar económicamente mi formación profesional, permitiéndome ser parte de la Universidad Nacional de San Luis y miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) lo que ha hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Ricardo D. Enriz, por su voto de confianza, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por su constante apoyo y aliento. Gracias por ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente.

Al grupo de modelado molecular, por ser una parte fundamental en el desarrollo de este trabajo. Quiero agradecer particularmente a Adriana Garro, Oscar Parravicini y Sebastián Andujar, por su ayuda y consejos día a día.

A los hombres de mi vida, Juan y Matías, que han hecho posible que cumpla cada sueño que he tenido. Por acompañarme en cada instante, alentándome a seguir y ayudándome en todas las formas posibles.

A mis padres, que han sido el mejor ejemplo a seguir, gracias por enseñarme a perseverar, por darme fuerzas y estar ahí en todo momento.

A mis hermanos y sobrinos, que desde la distancia siempre me apoyaron y alentaron todos mis logros.

A mis amigas, que a pesar del tiempo y la distancia, siguen estando ahí para lo que necesite.

Marcela Vettorazzi

La esfingosina quinasa (SphK) 1 y 2 son quinasas lipídicas que catalizan la formación de esfingosina-1-fosfato (S1P), una potente molécula de señalización con una amplia gama de efectos celulares como supervivencia celular, proliferación, angiogénesis, diferenciación, migración y función inmune, entre otras. Se ha demostrado que SphK1 y 2 se encuentran con una regulación incrementada en procesos tumorales y que su ablación o inhibición genética desaceleran el crecimiento tumoral y sensibilizan las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos. Dado que su estructura molecular ha sido recientemente reportada, en este trabajo de tesis se propuso estudiar las principales características estructurales de esta proteína, como así también buscar nuevos inhibidores para estas enzimas, en lo posible más potentes y específicos.

El presente trabajo es de naturaleza teórico-experimental y tiene un perfil integrativo y muy completo ya que se han realizado estudios de modelización molecular, síntesis química y ensayos biológicos. En el caso particular de los estudios de modelado, se han empleado diversas técnicas tales como cribado virtual, estudios de docking, simulaciones moleculares empleando dinámica molecular, análisis de descomposición por residuos, estudios de propensión dinámica de puentes de hidrógeno, modelado por homología y cálculos computacionales empleando altos niveles de teoría como por ejemplo análisis QTAIM (Quantum Theory of Atoms In Molecules), entre otros.

En este trabajo de tesis se han obtenido resultados de sumo interés tanto desde el punto de vista metodológico, como así también para la química medicinal en el diseño de nuevos ligandos. En el primer caso, mediante estudios de modelado molecular, se han adquirido importantes datos estructurales que son característicos del sitio catalítico de la enzima SphK1. Estos resultados permiten entender a nivel molecular, las particularidades del sitio activo de esta proteína que juega un rol central en diversos procesos fisiológicos de gran interés que incluyen procesos inflamatorios y el cáncer, entre otros. Además, mediante los estudios empleando cálculos QTAIM se ha demostrado la importancia de emplear estas técnicas en forma combinada con simulaciones de dinámica molecular para determinar que porciones de los ligandos deben ser modificados para poder aumentar sus afinidades con su blanco molecular.

Desde el punto de vista de interés de la química medicinal, se produjeron numerosos nuevos inhibidores para las enzimas en estudio. A partir de un estudio de cribado virtual, se obtuvieron nuevos andamiajes estructurales que podrían ser utilizados para el diseño de nuevos inhibidores. Por otro lado, utilizando como estrategia de diseño tomar como estructura inicial a conocidos inhibidores de SphK1, también se consiguió diseñar, sintetizar y medir biológicamente dos nuevas series de inhibidores

de esta enzima. Algunos de estos nuevos compuestos han mostrado una potente actividad inhibitoria, comparable a la de algunas moléculas actualmente en uso. Además, se logró obtener un nuevo inhibidor de SphK2, el cual puede actuar como potencial agente anticancerígeno y antinflamatorio.

Publicaciones y Presentaciones en Reuniones Científicas

Este trabajo de tesis ha dado lugar a 3 publicaciones y un trabajo actualmente en redacción. Asimismo, se han presentado 6 comunicaciones en reuniones científicas.

Trabajos Publicados

- An integrative study to identify novel scaffolds for sphingosine kinase 1 inhibitors. **Vettorazzi**, M.; Angelina, E.; Lima, S.; Gonec, T.; Otevrel, J.; Marvanova, P.; Padrtova, T.; Mokry, P.; Bobal, P.; Acosta, L.; Palma, A.; Cobo, J.; Bobalova, J.; Csollei, J.; Malik, I.; Alvarez, S.; Spiegel, S.; Jampilek, J.; Enriz, R. *European Journal of Medicinal Chemistry* (**2017**).
- Theoretical models to predict the inhibitory effect of ligands of sphingosine kinase 1 using QTAIM calculations and hydrogen bond dynamic propensity analysis. **Vettorazzi**, M.; Menéndez, C.; Gutiérrez, L.; Andujar, S.; Appignanesi, G. and Enriz, R. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (**2018**).
- Synthesis and Biological Evaluation of Sphingosine Kinase 2 Inhibitors with Anti-inflammatory Activity. **Vettorazzi**, M.; Vila, L.; Lima, S.; Acosta, L.; Yépes, F.; Palma, A.; Cobo, J.; Tengler, J.; Malik, I.; Alvarez, S.; Marqués, P.; Cabedo, N.; Sanz, M.; Jampilek, J.; Spiegel S. and Enriz, R. *Archiv Der Pharmazie* (**2018**).

Presentaciones en Reuniones Científicas

- A QM/MM study of the molecular interactions of different ligands and Sphingosine Kinase1 (SphK1). **Vettorazzi**, Marcela; Andujar, Sebastián; Gutiérrez, Lucas; Suvire, Fernando; Álvarez, Sergio; Enriz, Daniel. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. 3 al 5 de diciembre de **2014**. Sierra de la Ventana -Buenos Aires.
- Searching by molecular modeling of new inhibitors of Sphingosine Kinase 1 (SphK1). **Vettorazzi**, Marcela; Gutiérrez, Lucas; Rojas, Sebastian; Lezama, José; Sosa, Esteban; Andujar, Sebastián. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB). 4 al 6 de Noviembre de **2015**. Santiago del Estero, Argentina.
- Estudios de correlación entre datos cristalográficos, actividad inhibitoria y cálculos teóricos para esfingosina quinasa. **Vettorazzi**, Marcela; Rojas, Sebastián; Álvarez, María; Gutiérrez, Lucas; Enriz, Ricardo. XII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía (AACr). 9 al 11 de Noviembre de **2016**. San Luis, Argentina.
- Search of new structural scaffolds for Sphingosine kinase 1 inhibitors. **Vettorazzi**, Marcela; Rojas, Sebastián; Gutiérrez, Lucas; Andujar, Sebastián; Álvarez, Sergio; Enriz, Daniel. III Latin American Federation

of Biophysical Societies (LAFeBS) – IX IberoAmerican Congress of Biophysics - XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB). 23 al 25 de Noviembre de **2016**. San Miguel de Tucumán, Argentina.

- Diseño de nuevos inhibidores de SphK1. Correlación entre datos experimentales y cálculos teóricos. **Vettorazzi**, Marcela; Menéndez, Cintia; Gutiérrez, Lucas; Andújar, Sebastián; Apignanesi, Gustavo y Enriz, Daniel. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. (CAFQI). 16 al 19 de Mayo de **2017**. Carlos Paz, Argentina.
- Diseño, síntesis y evaluación biológica de inhibidores de esfingosina quinasa 2 con actividad antiinflamatoria. **Vettorazzi**, Marcela; Tosso, Rodrigo; Garcia Biasotti, Eugenia; Parravicini, Oscar; Gutierrez, Lucas; Andujar, Sebastían; Rodriguez, Ana María y Enriz, Ricardo. 5º Reunión Internacional del Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) - 50º Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). 14 al 16 de noviembre de **2018**. Ciudad de la Punta, San Luis, Argentina.

Capítulo 1
Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis». La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer. Aunque la razón por la que se desarrolla la enfermedad sigue siendo desconocida para muchos tipos de cáncer, diversos factores relacionados con el estilo de vida, como el consumo de tabaco y el exceso de peso corporal, y factores no modificables, como la genética hereditaria, mutaciones, hormonas, y condiciones inmunes son causas muy relevantes. Estos factores de riesgo pueden actuar simultáneamente o en secuencia para iniciar y/o promover el crecimiento del cáncer[1].

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo; en 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a los cinco principales factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol.

Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

- Pulmonar (1,69 millones de defunciones)
- Hepático (788.000 defunciones)
- Colorrectal (774.000 defunciones)
- Gástrico (754.000 defunciones)
- Mamario (571.000 defunciones)

El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso en varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a saber:

- carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes;
- carcinógenos químicos, como el amianto, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminante del agua de bebida), y
- carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos[2].

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy

probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad.

1.1.1. Características de los tumores sólidos

Las células tumorales sólidas en sí mismas son heterogéneas, y los tumores incluso del mismo tejido son muy diferentes entre los individuos, lo que puede explicarse por las diferencias en los genes mutantes, los sitios de mutación, los perfiles de expresión génica y la activación de las vías de señalización celular[2–5]. Hasta ahora, se ha desarrollado una variedad de fármacos antitumorales para atacar directamente las mutaciones genéticas[3,6,7], seleccionando así los fármacos dirigidos apropiados.

Sin embargo, en términos de crecimiento y metabolismo, los tumores sólidos son casi similares. Todos presentan una rápida proliferación, un crecimiento ilimitado y una invasión local o metástasis a distancia. Además, el microambiente tumoral que acompaña el desarrollo de diferentes tumores también es muy similar. En resumen, existen cuatro características principales del microambiente tumoral sólido, incluida la hipoxia tisular, el estrés oxidativo, los trastornos metabólicos y la inflamación crónica.

La hipoxia tisular es una disminución de los niveles de oxígeno a nivel tisular que resulta principalmente de dos aspectos: i) proliferación vascular anormal y exacerbada que le permite al tumor un crecimiento rápido debido a la liberación de factores angiogénicos y ii) glucólisis anaeróbica en condiciones aeróbicas debido al elevado consumo de oxígeno relacionado con el metabolismo tumoral. La hipoxia conduce a un metabolismo anormal del oxígeno y genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que hace que el microambiente tumoral se encuentre en un estado de estrés oxidativo, que es otra característica importante del mismo. La alteración metabólica es la tercera característica importante del microambiente tumoral. Como se mencionó anteriormente, la hipoxia induce cambios en el metabolismo del oxígeno y de la glucosa, los lípidos y las proteínas. Dicha perturbación incluye los cambios en la vía metabólica, las alteraciones en la estructura y función de las enzimas metabólicas, la producción anormal de intermediarios metabólicos y/o la producción de intermedios anormales. Las masas de metabolitos intermedios que resultan de la perturbación metabólica también pueden causar inflamación aséptica crónica. Así, se forma una reacción en cadena viciosa: hipoxia tisular, estrés oxidativo, alteración metabólica e inflamación crónica, que son las cuatro características de los microambientes tumorales.

1.2. Anticancerígenos

El mayor desafío en el desarrollo de fármacos contra el cáncer es diseñar un medicamento que se dirija a las células cancerosas con alta selectividad y especificidad. Es difícil identificar la mayoría de los tumores en el nivel primario y, en etapas posteriores, la metástasis del tumor puede conducir a muertes relacionadas con el cáncer[8–12]. Las diversas estrategias empleadas para el tratamiento del cáncer incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia que se usan solas o en combinación. Los quimioterapéuticos clásicos se dirigen directamente al ADN de la célula, mientras que los fármacos anticancerosos contemporáneos implican una terapia dirigida a los objetivos moleculares, como la orientación de las proteínas que poseen una expresión anormal dentro de las células cancerosas. Estos fármacos dirigidos a los objetivos moleculares matan selectivamente las células cancerosas con una toxicidad reducida hacia las células normales en comparación con los fármacos anticancerosos tradicionales[13]. Los fármacos dirigidos inhiben vías específicas de señalización celular que contribuyen al fenotipo maligno de las células cancerosas.

La quimioterapia ha mejorado gradualmente con el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. El tratamiento de algunas neoplasias malignas con la quimioterapia dirigida fue exitoso, sin embargo, el desarrollo de resistencia al fármaco y toxicidad para los tejidos y células normales son las principales limitaciones. Los transportadores de fármacos están sobre-expresados en muchas de las células cancerosas y reducen las concentraciones intracelulares de fármacos. Además, la evolución de mutaciones puntuales puede ser responsable de una mayor resistencia a los medicamentos. La resistencia a múltiples fármacos es un obstáculo importante para el tratamiento eficaz y la erradicación completa del cáncer.

La tasa de éxito y la eficacia del desarrollo de fármacos contra el cáncer son muy bajos en comparación con la inversión. El cáncer es una enfermedad multifactorial y la mayor parte del desarrollo de fármacos contra el cáncer se centró en un objetivo prometedor. La comunidad científica ha realizado muchos esfuerzos para la erradicación total y permanente del cáncer. Sin embargo, se ha logrado un éxito limitado debido a la compleja etiología de la enfermedad. Las razones de la falla del fármaco en la mayoría de las neoplasias malignas humanas se pueden atribuir a la comprensión incompleta de la patogénesis de la enfermedad y la sobrevaloración de la expresión del blanco molecular.

Se han identificado muchos objetivos farmacológicos para el tratamiento del cáncer. El trabajo de investigación reciente en el campo de la biología molecular y una mejor comprensión de la patología del cáncer a nivel molecular han desafiado a los investigadores a centrarse en los objetivos farmacológicos que pueden ayudar a erradicar por completo la enfermedad. Se ha observado que alrededor del 30% de los esfuerzos de

descubrimiento de fármacos contra el cáncer se centran en encontrar o validar los inhibidores de la quinasa. De manera similar, una búsqueda en las bases de datos PubMed mostró que la tubulina/microtúbulo, las células madre del cáncer y las vías de resistencia a múltiples fármacos son otros objetivos importantes en el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Además, los anticuerpos monoclonales y los agentes contra el cáncer que atacan a múltiples objetivos han atraído la atención de los investigadores para desarrollar fármacos efectivos para la erradicación completa de la enfermedad. Una serie de posibles candidatos a fármacos se encuentran en diversas etapas de ensayos clínicos.

Esta tesis está dirigida particularmente a la búsqueda de nuevos inhibidores de proteínas quinasas, por lo tanto no ahondaremos en los demás tipos de anticancerígenos y nos centraremos principalmente en la descripción de las quinasas.

1.3. Las proteínas quinasas como blancos moleculares

Las proteínas quinasas son fosfotransferasas dependientes de ATP que transfieren un grupo fosfato de la posición γ de ATP al grupo hidroxilo de la serina, treonina y tirosina. El proceso generalmente es catalizado por el ion Mg^{2+} que también ayuda en la unión de ATP[14,15]. Se han confirmado un total de 538 quinasas humanas (divididas en 7 familias típicas y 7 familias atípicas) y 900 genes que encriptan proteínas con actividad quinasa[16,17]. Aunque hay grandes diferencias en la secuenciación de aminoácidos de las proteínas quinasas, sin embargo, la mayoría de ellas tienen una estructura de proteína similar[18]. Hay aproximadamente 2000 quinasas estimadas en el genoma humano que son específicas de serina/treonina o tirosina y están estrechamente relacionadas entre sí. Estas proteínas juegan un papel en la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación, el metabolismo de diversos sustratos y en un gran número de otros procesos celulares implicados en la supervivencia celular[19].

Los inhibidores de proteínas quinasas en general interactúan directamente con el sitio activo de la enzima e inhiben su función. Se han explorado varios inhibidores de quinasas de moléculas pequeñas como agentes antitumorales y aproximadamente 80 inhibidores se encuentran en una etapa avanzada de ensayos clínicos[20,21].

1.4. Características de S1P

Los esfingolípidos y sus derivados son importantes componentes estructurales y funcionales de las membranas celulares de los mamíferos. Los metabolitos de esfingolípidos, en particular la ceramida, la esfingosina-1-fosfato (S1P) y la ceramida-1-fosfato (C1P), son mediadores de lípidos que regulan variadas funciones celulares que incluyen crecimiento celular,

supervivencia, migración, tráfico de células inmunitarias, angiogénesis, inflamación y cáncer[22–24]. Mientras S1P y C1P mejoran la señalización de supervivencia celular[25,26], ceramida favorece la apoptosis y muerte celular.

Esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido polar que desempeña numerosas funciones fisiológicas en diferentes enfermedades. Se encuentra presente en altas concentraciones en el plasma (1 μM) y linfa (100 nM), y en bajas concentraciones en los tejidos, creando un gradiente de S1P[27]. A nivel plasmático, los eritrocitos y las células endoteliales son la principal fuente de S1P, en tanto que en la linfa, las células del endotelio de vasos linfáticos mantienen sus niveles. S1P circula unida a proteínas séricas, principalmente a la lipoproteína HDL y en menor medida a la albúmina, ambas transportan S1P facilitando sus funciones paracrinas y lo protegen de la degradación[28].

A nivel fisiológico, S1P es fundamental en la etapa embrionaria para el desarrollo del sistema cardiovascular y el sistema nervioso, y en la etapa posnatal para el mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos[29]. Además, el gradiente de S1P establecido entre tejidos y plasma o linfa, impulsa la salida de células hematopoyéticas de los órganos linfoides hacia la circulación periférica[30].

En cuanto a patologías, S1P es un lípido inflamatorio, y tiene funciones importantes en el desarrollo de enfermedades inflamatorias-autoinmunes como la esclerosis múltiple, colitis ulcerativa, síndrome de Crohn, anemia falciforme[30], y se ha asociado a distintas características del cáncer, como el desarrollo de inflamación crónica, crecimiento sostenido, angiogénesis, resistencia a la apoptosis, invasión y metástasis[31,32].

Los niveles intra y extracelulares de S1P están minuciosamente regulados por el equilibrio entre su formación, catalizada por enzimas esfingosina quinasas (SphK), y su degradación, catalizada por liasas de esfingosina-1-fosfato (SPL) y fosfatasas de esfingosina-1-fosfato (SPP) (Figura 1).

Dos SphKs has sido descriptas, esfingosina quinasa 1 (SphK1) y esfingosina quinasa 2 (SphK2)[33]. Dados los numerosos procesos importantes que dependen de la ruta SphK/S1P, es vital que tengamos una comprensión sólida de los mecanismos por los cuales está regulada.

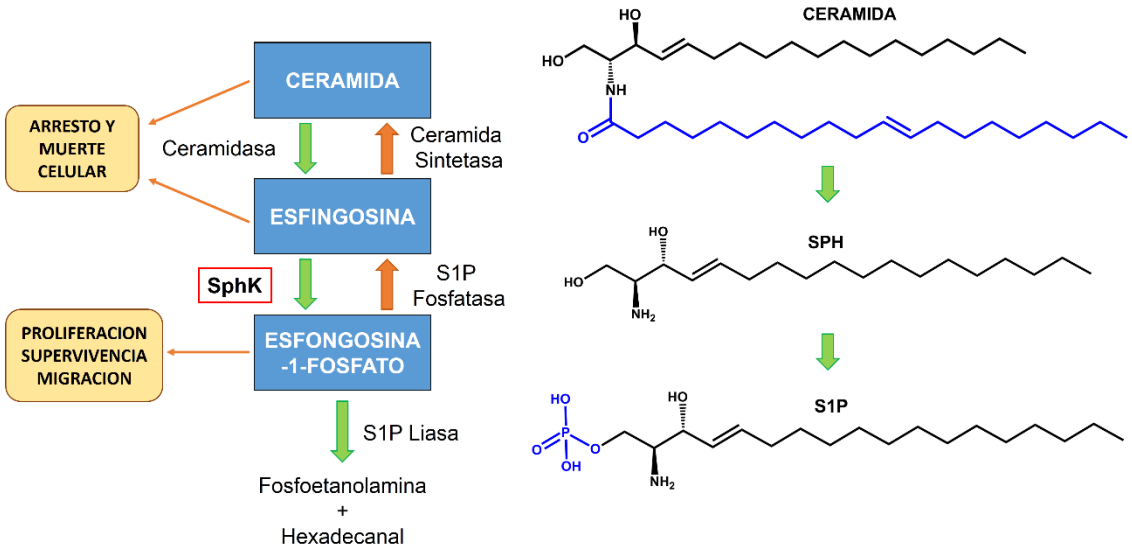


Fig. 1. Esquema de la interconversión de esfingolípidos bioactivos. Se muestra la estructura de cada uno de los esfingolípidos bioactivos.

1.4.1. Vías de señalización en las que participa S1P

Luego de ser sintetizada, S1P puede ser exportada fuera de la célula tanto por transportadores específicos Spinster 2 (Spns2)[34], o por algunos miembros de la familia de transportadores ABC[35]. En consecuencia, S1P exacerba funciones extracelulares mediante la unión a cinco receptores específicos acoplados a proteína G (GPCR), conocidos como S1PR1-5[33–37] (Figura 2). Esta acción autócrina y/o parácrina es conocida como "*de adentro hacia afuera*" y es crítica para una gran variedad de respuestas celulares. Aunque la mayoría de las acciones de S1P son mediadas por S1PRs, en los últimos años se ha hecho evidente que S1P también exacerba funciones intracelulares mediante la regulación de diferentes blancos moleculares[32,38].

Muchos agonistas distintos, entre ellos citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, entre otros, inducen la translocación de SphK1 a la membrana plasmática, donde reside su sustrato esfingosina, lo que lleva a la activación de la enzima. La translocación de SphK1 depende de su fosforilación en S225 por ERK1/2[39] y de la interacción con el calcio y la proteína de unión a integrina 1 (CIB1)[40]. De hecho, una mutación de SphK1 en el residuo S225 se comporta como un dominante negativo, aunque la proteína mantiene su actividad de quinasa[39]. La translocación de SphK1 también resulta en la producción de S1P en una ubicación que permite su exportación extracelular, lo que lo hace fácilmente disponible para que la ligadura a S1PRs desencadene la señalización "*de adentro hacia afuera*". Por otro lado, SphK2 se encuentra en varias organelas, incluyendo el núcleo y

el retículo endoplásmico (Figura 2). Aunque se sabe mucho menos sobre la activación de SphK2[41], también es fosforilada y activada por ERK1[42].

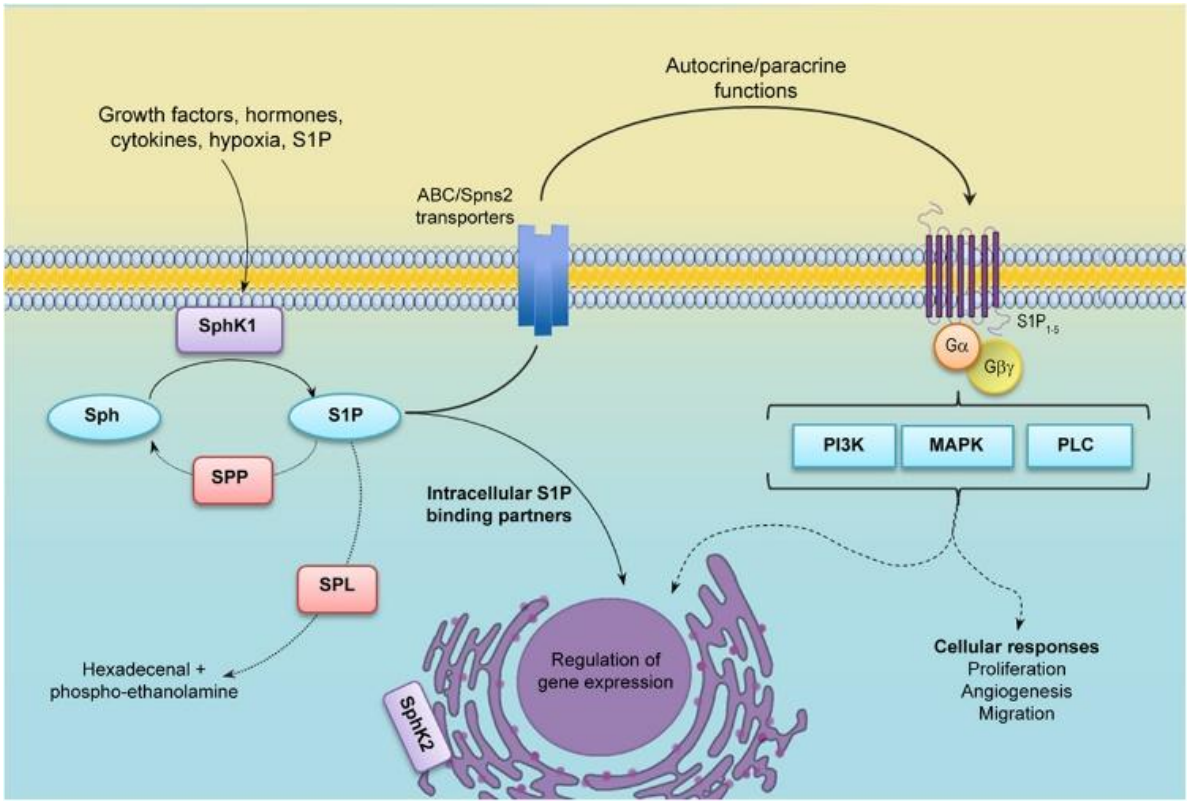


Fig. 2. Metabolismo y señalización de S1P. Muchos agonistas estimulan SphK1 en el citosol, produciendo su translocación a la membrana plasmática, donde utiliza a esfingosina como sustrato para generar esfingosina-1-fosfato (S1P). S1P puede ser degradada irreversiblemente por S1P liasa (SPL) o desfosforilada por S1P fosfatasas (SPP). Luego de ser secretada por transportadores específicos, S1P se une y activa a sus receptores (S1PR1-5) de forma parácrina o autócrina, regulando así muchas funciones celulares. También puede actuar como segundo mensajero intracelular, mediante la unión a diferentes compuestos. Figura extraída de la referencia[32].

Los S1PRs se acoplan a distintas proteínas G heterotriméricas que conducen a la activación posterior de diversas vías efectoras, incluidas la fosfolipasa C (PLC), la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), entre otras[43]. La respuesta funcional de cada célula a S1P varía dependiendo de su repertorio de S1PRs que también está modulado por varias señales[44].

El receptor S1PR1 tiene un papel central en la migración celular y sin duda está involucrado en la angiogénesis y el tráfico de células inmunitarias. Un gradiente de S1P caracteriza las condiciones fisiológicas, donde los niveles de S1P son elevados en la sangre y la linfa y bajos en los tejidos. Este gradiente es importante para la integridad vascular y permite la salida de células inmunitarias de los órganos linfoides a la circulación[45]. Además, los altos niveles de S1P producidos durante los procesos inflamatorios conducen el reclutamiento de células inmunitarias a los

tejidos inflamados. Durante el desarrollo embrionario[46] y la progresión tumoral, el eje S1P/S1PR1 promueve el reclutamiento de precursores endoteliales y el desarrollo vascular. El papel crucial de S1PR1 en la migración de linfocitos culminó con el rápido desarrollo de **FTY720** (Fingolimod) como un fármaco inmunosupresor, aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) para el tratamiento de recurrentes formas de esclerosis múltiple (EM). **FTY720** induce la endocitosis y degradación de S1PR1, evitando así la salida de linfocitos y la inflamación, un sello distintivo de la EM[47].

En su mayor parte, se ha demostrado que la unión de S1PR1 promueve la migración de varias líneas celulares de cáncer[48–51], mientras que S1PR2 ejerce un efecto contrario[52–54]. De hecho, la estimulación[48] o la inhibición[55] de la migración inducida por S1P en células de melanoma depende de la expresión de S1PR1 o S1PR2, respectivamente. Sin embargo, algunos informes también establecieron un papel positivo de S1PR2 en la migración[56,57], indicativo de un papel complejo de S1PRs en la motilidad celular. Similar a S1PR1, la activación de S1PR3 promueve la migración. Ciertamente, se ha descripto el papel de S1PR3 en la motilidad celular para las células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea[58], las células de cáncer de mama humano[59] y las células progenitoras endoteliales[60], que son importantes en la angiogénesis tumoral. Además, en las células de cáncer gástrico, el equilibrio entre la expresión de S1PR3 y S1PR2 es una característica crítica para decidir si la célula aumentará (S1PR3) o disminuirá (S1PR2) su capacidad migratoria[61].

Las expresiones de S1PR4/5 son más limitadas, y los mecanismos que regulan se entienden menos. Sin embargo, se sabe que S1PR4 promueve el tráfico de neutrófilos[62] y la diferenciación de las células dendríticas[63], mientras que S1PR5 se ha asociado con el tráfico de células asesinas naturales (NK)[64,65]. Muchos estudios, en los últimos años, han demostrado claramente que la S1P también puede funcionar como un mediador intracelular. El grupo de la Dra. Spiegel ha demostrado que S1P se une y modula la función de diferentes dianas intracelulares, incluido el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) 2: (TRAF2)[38], histona desacetilasas: HDAC1 y HDAC2[66] y prohibitina 2[67]. Informes recientes también indican que S1P se une al receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPARγ) en las células endoteliales y estimula la angiogénesis[68].

En la Figura 3 se muestran, de manera resumida, todas las acciones que se llevan a cabo a partir de la activación de los diferentes receptores S1PRs.

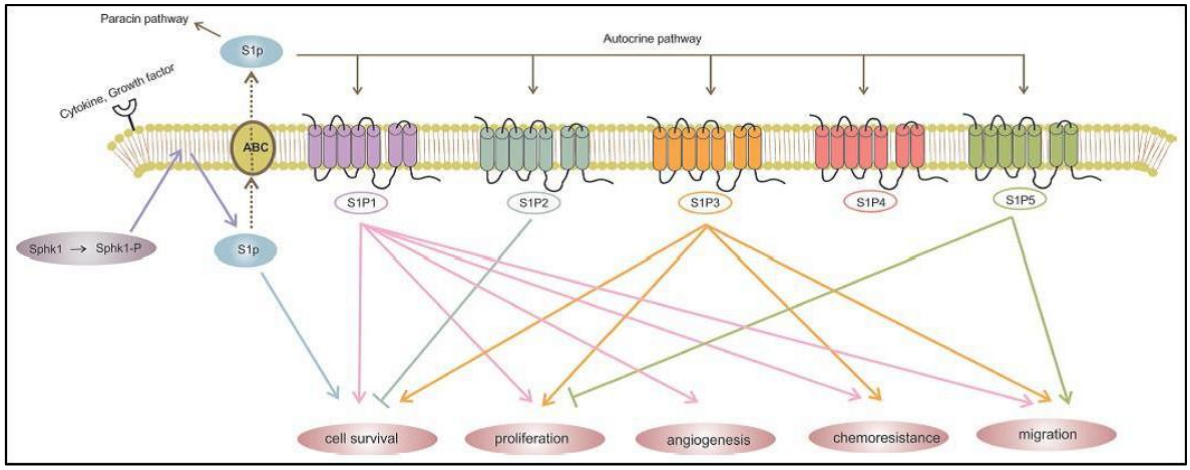


Fig. 3. Efecto de la activación de receptores. La S1P producida por SphK1 puede actuar de forma autócrina para estimular la supervivencia celular, proliferación, angiogénesis, quimioresistencia y migración, mediante la activación de distintos receptores.

1.5. Características de SphK1

Como ya ha sido anteriormente dicho, existen dos clases de SphKs en células de mamíferos, SphK1 y SphK2. En los humanos, se generan a partir de dos genes distintos, donde SphK1 y SphK2 se ubican en el cromosoma 17 (17q25.2) y 19 (19q13.2), respectivamente. Aunque SphK1 y SphK2 humano varían considerablemente en tamaño (384 y 618 aminoácidos para SphK1 y SphK2, respectivamente)[69], comparten 80% de similitud y 45% de identidad de secuencia general, con casi toda la secuencia polipeptídica de SphK1 alineada con las regiones del SphK2 más grandes (Figura 4). Todas las SphKs eucariotas conocidas comparten cinco regiones altamente conservadas dentro de su secuencia (denominadas C1-C5;), que parecen abarcar las regiones necesarias para la unión y la catálisis de ATP[70].

SphK1 es una proteína de 384 aminoácidos, con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 6,47. Estructuralmente adopta un plegamiento de dos dominios, común entre miembros de la superfamilia de proteínas similares a fosfofructoquinasas (PFK). Sin embargo, contiene una porción C-terminal característica, que la distingue de otras proteínas de esta familia[71].

En la región de interferencia del dominio de SphK1, existe una cavidad accesible para el solvente, en la que los nucleótidos se asientan a la espera de un sustrato al cual transferirle su fosfato-gamma. En esta cavidad existe un motivo S/G79-GDG82 altamente conservado que guarda relación con la actividad de la enzima y, en el que las mutaciones tienen un efecto inactivante sobre SphK1[71,72]. Una de las dos aperturas a la cavidad del ligando se encuentra alineada con residuos del dominio C-terminal mediante el motivo S/G79-GDG82. Se ha propuesto que dentro de la cavidad, esfingosina es guiada por un mecanismo de canalización cola-cabeza impulsado por interacciones energéticamente favorables entre

residuos apolares de la cavidad y carbonos alifáticos de la cola de la esfingosina[71,72].

Si bien actualmente no hay estructuras cristalinas disponibles para permitir comparaciones entre las dos SphKs, la región central (rica en prolina) de SphK2 parece coincidir con la región de unión a la esfingosina de estas enzimas[73]. De acuerdo con esto, la información bioquímica con respecto a la especificidad del sustrato y la inhibición de las dos SphKs sugieren que existen diferencias significativas en sus bolsillos de unión al sustrato. SphK2 es más promiscuo que SphK1 en los sustratos que puede fosforilar, y se han desarrollado varios inhibidores selectivos de las isoformas que se dirigen al sitio de unión de la esfingosina de estas enzimas[74,75]. Sorprendentemente, debido al alto grado de conservación de la secuencia en las regiones supuestas de unión a ATP, un estudio reciente también ha informado sobre un inhibidor competitivo de ATP que muestra una alta selectividad por SphK1[74], lo que sugiere que al menos algo de divergencia también ocurre entre SphK1 y SphK2 en este bolsillo. La evidencia experimental ha demostrado que el mutante puntual G212E suprime completamente la actividad catalítica de SphK2[76] al igual que la mutación de G82D comparable en SphK1[77].

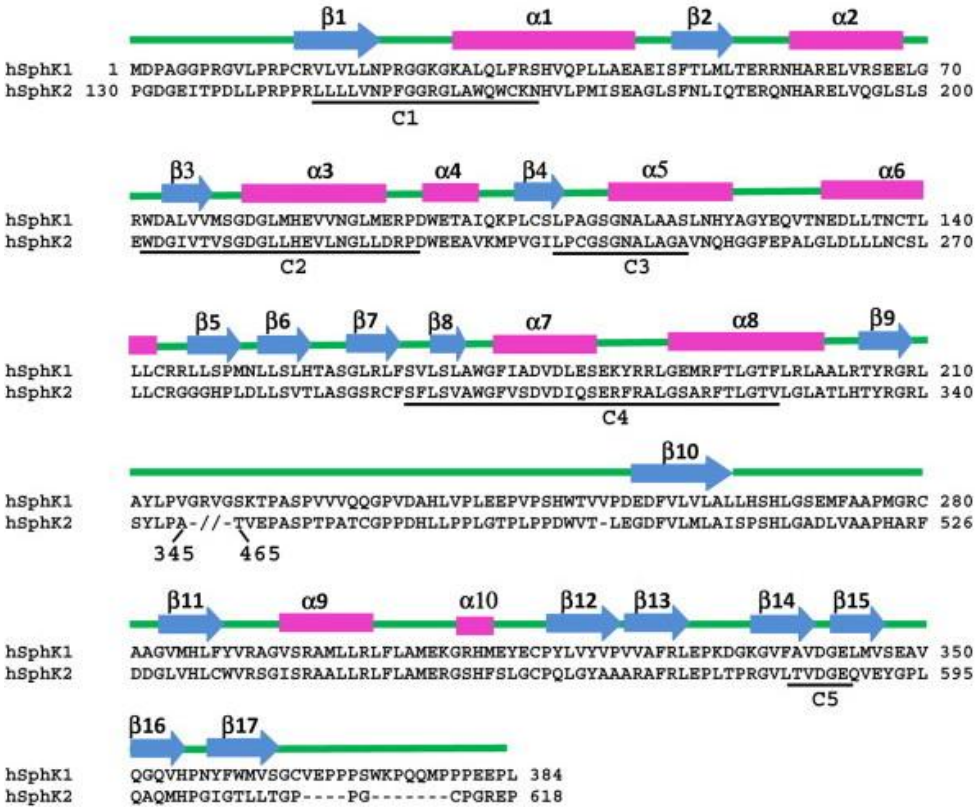


Fig. 4. Estructura secundaria de SphK1 y SphK2 humano. Las dobles barras (-//-) indican una gran inserción en la secuencia de SphK2 (345-465 aminoácidos). Sobre las secuencias se indican las zonas correspondientes a α-hélices u hojas β de acuerdo a la estructura terciaria de la proteína. Debajo de las secuencias se indican las zonas correspondientes a cada dominio C1-C5. Figura extraída de la referencia[71].

1.5.1. Arquitectura general de SphK1

La arquitectura general de SphK1 es bilobular, con lóbulos N y C (Figura 5A) que consta de 15 hojas β, 10 α-hélices y hélices 3_{10}. El lóbulo N alberga el sitio de unión a ATP (Figura 5A y B), mientras que el bolsillo de unión a la esfingosina está enterrado dentro del lóbulo C (Figura 5A-D). El pliegue total del lóbulo N es similar al pliegue de Rossmann de un sándwich α/β/α de tres capas. El lóbulo C está compuesto por una hoja β antiparalela de 11 hilos rodeada por las hélices α7-α9 y una hélice 3_{10}. La hendidura catalítica se ubica entre los lóbulos N y C y es donde se coloca el motivo catalítico (S/G)GDG. Este motivo catalítico se conserva entre la superfamilia de tipo PFK y se conserva parcialmente con los bucles de proteína quinasas ricos en glicina[78].

1.5.2. Sitio de unión a la esfingosina

Otra característica revelada por la elucidación estructural de SphK1 es una bolsa hidrófoba profunda, bien definida, con forma de "J" donde se une la esfingosina (Figura 5C). El contorno distintivo de este bolsillo aloja el sustrato en una conformación plegada. Como lo demuestran los estudios previos, el bolsillo de unión al sustrato de SphK1 está comprendido, en parte, por el dominio C4 menos conservado, como se evidenció en estudios previos[80,81].

Se han identificado un par de residuos clave que son responsables del reconocimiento de la esfingosina. Yokota et al. (2004)[81] muestran que D178 es importante para el reconocimiento de la esfingosina por SphK1 como lo sugiere la disminución de la cinética de Michaelis-Menten tras la mutación realizada por Wang et. al (2013)[71].

El bolsillo de unión de la esfingosina, más allá del sitio de unión para el grupo de cabeza polar, está revestido con una serie de residuos hidrófobos/no polares que incluyen: 7 leucinas, 4 fenilalaninas, 4 alaninas, 2 valinas, 2 metioninas y 1 isoleucina (Figura 5D).

Algunas especificaciones más precisas sobre la estructura de la proteína se desarrollarán con mayor detenimiento en el capítulo 3 de esta tesis.

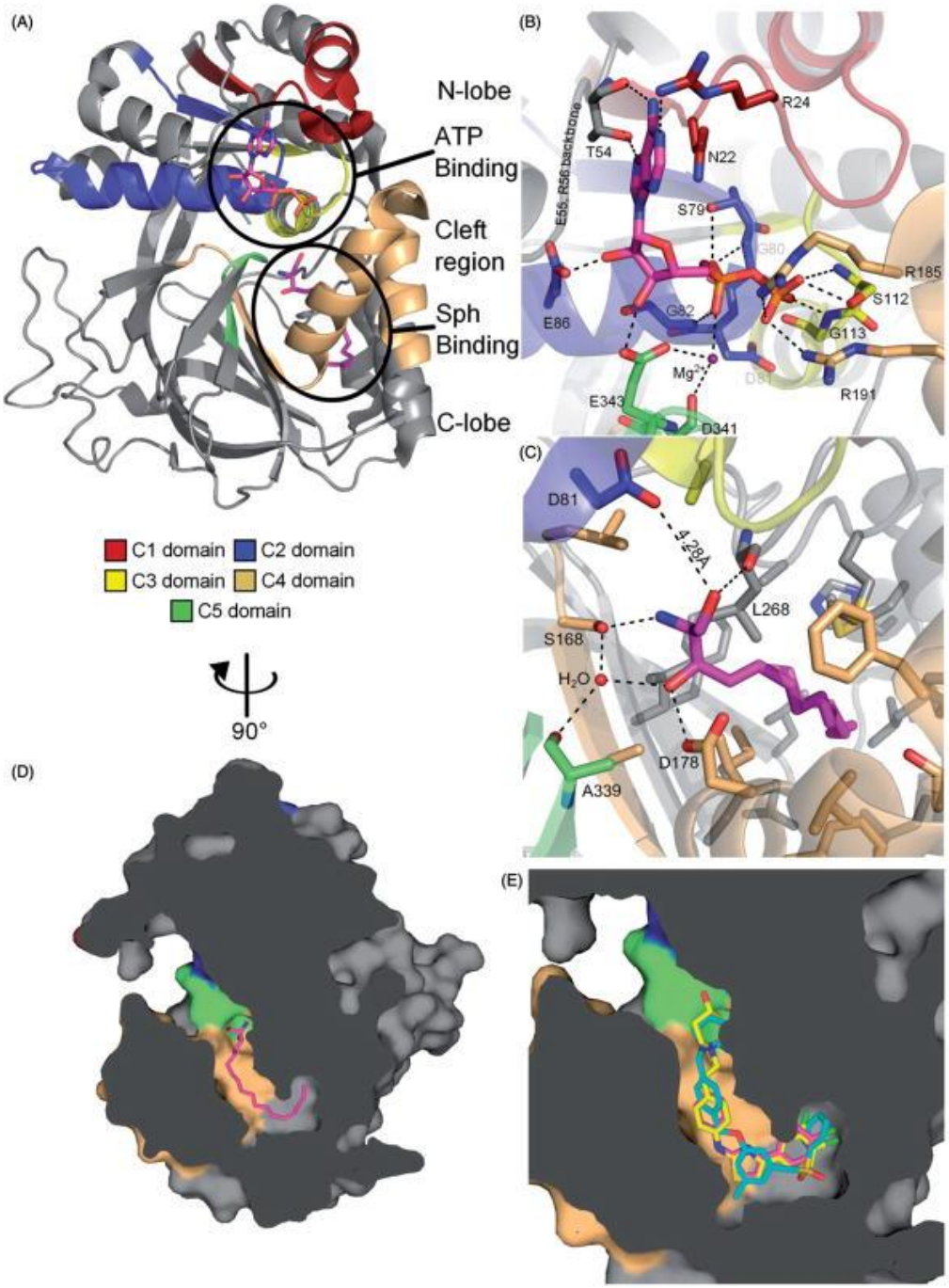


Fig. 5. Vista estructural de SphK1. **(A)** Una visión general de la estructura SphK1. Los dominios conservados, C1-C5, se resaltan en rojo, azul, amarillo, beige y verde, respectivamente. La estructura tiene un pliegue total de dos lóbulos con los sitios de unión que contienen el lóbulo N y el lóbulo C para ATP y esfingosina (en círculos negros), los cuales se muestran como estructuras de barras color magenta. **(B)** Interacciones de unión a ATP. ADP (magenta) se muestra junto con los residuos más importantes interactuantes de SphK1. Los residuos que interactúan se colorean en coordinación con el dominio al que pertenecen como en el panel A. Las líneas discontinuas representan enlaces puentes de hidrógeno. **(C)** Interacciones de unión a la esfingosina. Se muestran los residuos ubicados a 5 Å de esfingosina en color magenta. Las líneas discontinuas representan enlaces

puentes de hidrógeno. Se observan numerosos residuos hidrófobos/no polares que recubren la bolsa donde se une la cadena de hidrocarburo, mientras que cerca del grupo de la cabeza hay residuos polares/cargados. **(D)** Corte de superficie de SphK1. Una representación superficial de SphK1 se ha recortado cerca del bolsillo de unión de la esfingosina. Esto revela la profundidad general y la naturaleza "en forma de J" del bolsillo de unión de esfingosina (magenta) en SphK1. **(E)** Descripción de la unión del inhibidor. Los inhibidores (**SKI-II**, (magenta); **PF-543**, (cian); **1v2**, (amarillo)) se muestran dentro del sitio activo de SphK1. Figura extraída de la referencia [79].

1.5.3. Rol de S1P y SphK1 en cáncer

Numerosos estudios muestran que tanto SphK1 como S1P promueven el crecimiento tumoral, la resistencia a apoptosis, angiogénesis y metástasis[82,83]. Sus niveles se encuentran aumentados en tejidos cancerosos y su expresión está correlacionada con la resistencia a tratamientos químicos y radiológicos[84,85]. La secreción de S1P desde células tumorales actúa de forma autócrina para promover el crecimiento, supervivencia, movilidad y metástasis; o de forma parácrina para inducir la producción de moléculas de adhesión endotelial, angiogénesis y regulación de células inmunes (Figura 6).

- **Metabolismo de enzimas**: Se ha demostrado que los niveles de S1P y la expresión y/o actividad de SphK1 están aumentadas en ciertos tipos de cánceres, con desregulación de la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de S1P. La inhibición de SphK1, con la subsecuente disminución de S1P, induce apoptosis en células de leucemia mieloide aguda[32].
- **Como factor pronóstico**: Los niveles aumentados de expresión de SphK1 han sido asociados con mayor tamaño tumoral, menor supervivencia, recurrencia o pobre prognosis en carcinoma hepatocelular (HCC), astrocitoma y pacientes con cáncer de mama. En otros tipos de cáncer su expresión es correlacionada con invasión y metástasis[32].
- **S1P y resistencia a terapias**: Existen evidencias que indican que S1P puede tener un rol potencial en quimioresistencia, en el pobre resultado de terapias y en la reincidencia del tumor. De forma similar, la expresión y actividad de SphK1 se ven aumentadas en células resistentes a otros medicamentos. Estas evidencian apoyan los ensayos clínicos actuales para el uso de drogas clásicas quimioterapéuticas en conjunto con inhibidores de SphK1[32].
- **Modulador del microambiente tumoral**: se ha propuesto que las diferentes funciones de S1P en los distintos tipos celulares pueden tener un rol importante no solo en la regulación de células tumorales, sino también en el establecimiento de un microambiente que facilita la metástasis y favorece al desarrollo canceroso. El microambiente tumoral está poblado de células tumorales y células estromales no-

neoplásicas como linfocitos, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, mastocitos y células endoteliales. S1P es un lípido quimio-atrayente para diversos tipos celulares. S1P liberada de células apoptóticas cancerosas actúa como una fuerte señal atrayente para monocitos. Inhibe la muerte celular e induce la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 anti-inflamatorio, aumenta la IL-10 y la prostaglandina E2, incrementando la migración de células endoteliales y la angiogénesis. Promueve el crecimiento de células tumorales y disminuye la respuesta inmune[32].

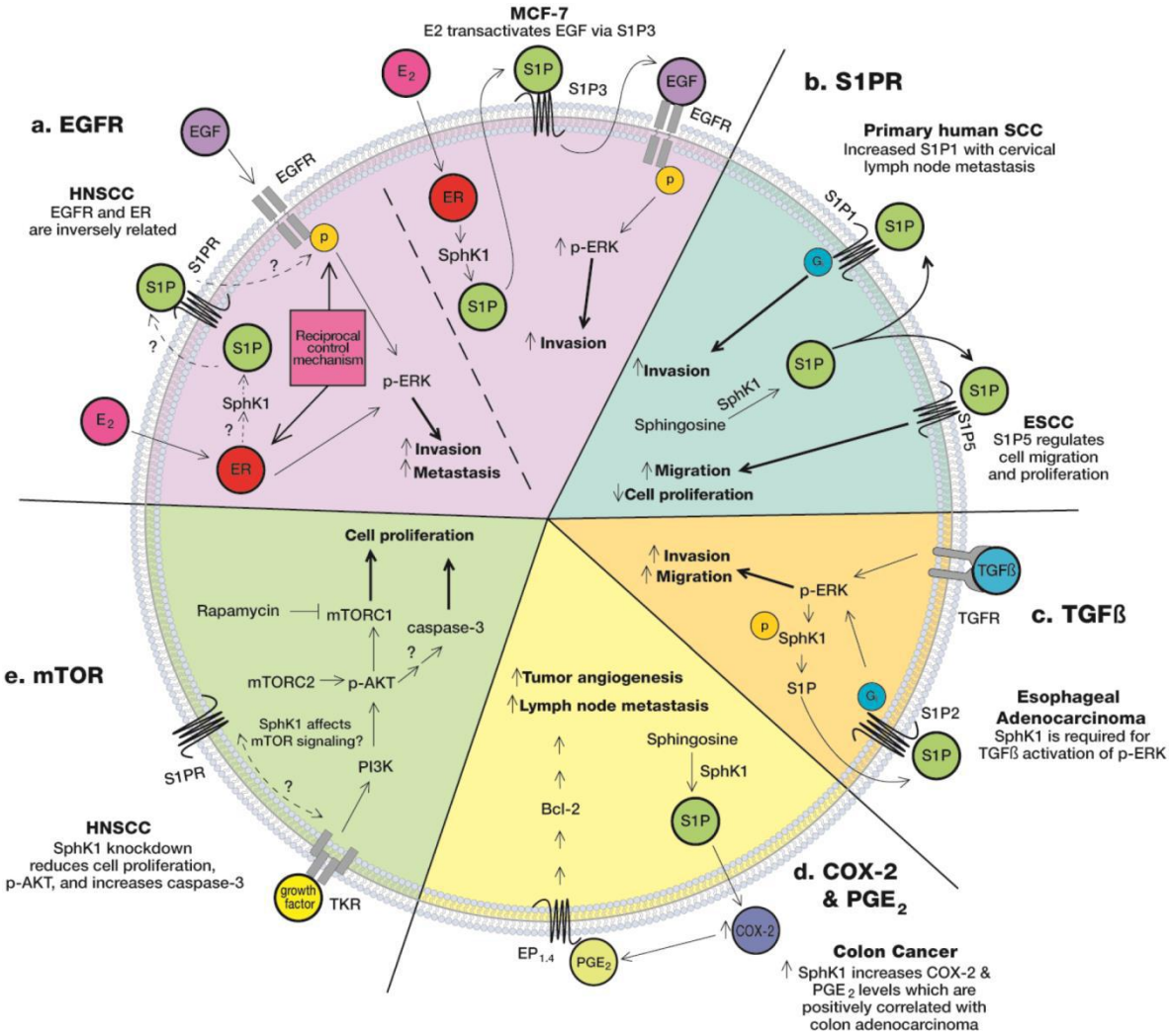


Fig. 6. Vías de señalización en las que participa S1P. S1P participa como intermediario de diversas vías intracelulares relacionadas con procesos inflamatorios y el desarrollo de cáncer. Actúa de forma autócrina o parácrina a través de sus receptores (S1PRs) y contribuye a un aumento en la capacidad migratoria e invasiva, angiogénesis y proliferación celular, entre otros. Figura extraída de la referencia[86].

Por otro lado, S1P regula la activación de NF-kB mediante mecanismos intra y extracelulares, involucrando a S1PR1 y diferentes tipos celulares[38,87]. La S1P intracelular generada por SphK1 es requerida para la actividad E3 ubiquitina ligasa de TRAF2, ligando la señalización de TNF a la activación

de NF-kB en distintos tipos de células cancerígenas, como melanoma. En macrófagos, la activación de este mediador también promueve el cambio hacia un fenotipo M2. También S1P regula la activación de STAT3 en distintos tumores, mediante la estimulación de S1PR1.

- **SphK1:** Regula la interacción entre diferentes células desde el microambiente tumoral. La expresión de SphK1 en varios tipos de cánceres aumenta el crecimiento tumoral, induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y media la interacción entre el tumor y células estromales, llevando a la progresión tumoral[32].
- **Hipoxia:** La falta de oxígeno es una característica típica del microambiente de tumores sólidos y puede estimular o inhibir la proliferación dependiendo del tipo celular. El factor de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1α) es el regulador maestro de la respuesta a la falta de oxígeno y puede ser regulado por S1P y SphK1. Esta última puede controlar la expresión y actividad transcripcional mediante un mecanismo dirigido por fosfolipasa D (PLD). La condición de hipoxia también sostiene la polarización hacia macrófagos M2, probablemente mediante señalización S1P. La inhibición de S1P reduce hipoxia *in vivo* y modifica la estructura de los vasos intratumorales, resultando en una mejor distribución de células antitumorales[32].

1.6. Inhibidores de SphK1

SphK1 se ha convertido en un posible blanco terapéutico en el cáncer, ya que hay un aumento en el nivel de proteínas y en la actividad enzimática en varios tipos de cáncer. Antes de la elucidación de la estructura de SphK1, muchos de los inhibidores disponibles son análogos de la esfingosina junto con algunos inhibidores no lipídicos. Los principales problemas asociados con estos primeros inhibidores fueron la falta de especificidad y potencia. Algunos de los primeros inhibidores de SphK fueron análogos de la esfingosina que incluyen **D,L-treo-dihidroesfingosina** (**Safingol**)[88], **dimetilesfingosina** (**DMS**)[89], **FTY720** (**Fingolimod**) y su compuesto hijo ***(S)*-FTY720-vinilfosfonat**o[90] y **SK1-I**[91].

Safingol presenta una actividad de inhibición de SphK1 cercana a ~13 μM (IC_{50})[88], y se ha demostrado que inhibe una gran cantidad de isoformas de proteína quinasa C, así como inhibe la fosforilación de varias vías asociadas al crecimiento[92]. Dicho esto, **Safingol** se ha utilizado en un ensayo clínico de fase I para el tratamiento de tumores sólidos[93].

Además de inhibir SphK1, se ha demostrado que **DMS** inhibe tanto SphK2[69] como CERK[94], lo que hace difícil descifrar el papel de SphK1. Por otro lado, se ha demostrado que SK1-I es un inhibidor de SphK1 específico de isozima que no inhibe SphK2[91].

FTY720 se fosforila por SphK2 para convertirse en **FTY720**-P. Se identificó finalmente como un antagonista funcional de los receptores de esfingosina-1-fosfato (S1PRs)[95,96] y se utiliza en la clínica para el tratamiento de la esclerosis múltiple[97]. Sin embargo, se ha demostrado que **FTY720** puede inhibir competitivamente SphK1[98]. Además, se ha descubierto que la familia **FTY720** de inhibidores de SphK1 puede causar la degradación proteosomal de SphK1[90].

Se han identificado inhibidores adicionales de SphK no lipídicos, incluidos **SKI-II**[99], **PF-543**[100], **SK1-178**[101] y **RB-005**[102]. Tras la elucidación de la estructura SphK1, se ha producido una explosión de nuevas moléculas identificadas mediante el diseño guiado por estructuras y el modelado computacional[103,104]. Hasta la fecha, tres moléculas pequeñas no lipídicas, todas inhibidores de la esfingosina en forma competitiva, se han co-cristalizado con SphK1 (Figura 5E): **SKI-II** (magenta), **PF-543** (cian) y **1v2** (compuesto 23) (amarillo)[104].

SKI-II se identificó a partir de una serie de compuestos de una biblioteca y se descubrió que inhibe SphK1 de una manera ATP-no competitiva con un IC_{50} aproximado de 500 nM[99]. Se demostró que este compuesto tenía actividad antitumoral, ya que podía reducir el volumen del tumor en ratones[105]. **SKI-II** se ha cristalizado recientemente con SphK1 y se ha demostrado que está unido al fondo de la bolsa de unión de la esfingosina, formando interacciones de van der Waals con varios residuos hidrófobos. También establece un enlace puente de hidrógeno con D178 e interactúa con el grupo hidroxilo de T196[71].

Los otros dos compuestos co-cristalizados, **PF-543** (Figura 5E, cian) y **1v2** (Figura 5E, amarillo) aprovechan al máximo la bolsa de unión de la esfingosina. **PF-543** aprovecha las numerosas interacciones de van der Waals, pero a diferencia de **SKI-II**, tiene interacciones adicionales en la región de unión del grupo principal que confieren su potencia. Además, forma enlaces puentes de hidrógeno con D264 (equivalente a D178 en la variante 1 de SphK1 humana). Estas características hacen que el **PF-543** sea el más potente y específico de cualquiera de los inhibidores de SphK1 identificados hasta la fecha. **PF-543** tiene un IC_{50} en células de aproximadamente 2 nM y es más de 300 veces más selectivo para SphK1 que SphK2[100,106].

El tratamiento de las células con **PF-543** no aumenta las ceramidas endógenas[100], lo cual es intrigante porque se esperaría que la inhibición de SphK1 produjera un aumento vinculado en los niveles de ceramida. Es posible que la inhibición de SphK1 por **PF-543** no afecte ningún proceso biológico porque no posee propiedades farmacocinéticas deseables que se requieren para la ablación de dicha actividad biológica. Otra posibilidad es que SphK1 podría desempeñar un papel en la célula que sea independiente de su actividad, ya que existe un fenotipo de supervivencia y crecimiento para la eliminación de SphK1 en líneas celulares[107]. La razón exacta de la

discrepancia entre la inhibición y la caída de SphK1 sigue sin estar clara y justifica una investigación adicional.

El compuesto **1v2** fue identificado a partir de una serie basada en estructura de inhibidores de SphK por Gustin et al. (2013)[104]. De manera similar a los otros dos inhibidores co-cristalizados, el compuesto **1v2** asume una conformación plegada en forma de "J" (de una manera similar a la configuración de unión de la esfingosina) para que se ajuste a la forma del bolsillo de unión de la esfingosina. De forma análoga al mecanismo de unión de **PF-543**, **1v2** interactúa con los residuos hidrófobos y D178[104]. Sin embargo, en contraste, **1v2** forma enlaces puente de hidrógeno con D81 y participa en la red de enlaces de hidrógeno mediada por agua (Figura 5D) [104]. Varios compuestos de esta serie son específicos para SphK1 y tienen propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas favorables que parecen prometedores desde el punto de vista terapéutico[104].

Sobre la base de estudios estructurales anteriores, se sugirió que tras la unión del sustrato existe un movimiento dentro de SphK1[71]. Sería fácil suponer SphK1 puede tomar diferentes conformaciones y que éstas pueden estar relacionadas con su activación. Los estudios de resonancia magnética nuclear son necesarios para comprender los mecanismos subyacentes a la activación de SphK1 y la unión al sustrato. El trabajo adicional para comprender la unión a la membrana y el desarrollo de nuevos mecanismos de inhibición (como los inhibidores competitivos bi-sustrato) será imprescindible para comprender cómo funciona SphK1 y cómo anular su actividad en la enfermedad.

Existe un interés creciente en los efectos terapéuticos del primer inhibidor selectivo para SphK2, **ABC294640**[75]. Este agente biodisponible por vía oral se dirige específicamente a SphK2 de una manera competitiva con la esfingosina con un Ki de 9,8 μM. No se observó ningún efecto con **ABC294640** en SphK1, o en la diacilglicerol quinasa estrechamente relacionada, en concentraciones de hasta 100 μM[74,75]. Se han realizado varios estudios que documentan los efectos de este inhibidor en una variedad de modelos de enfermedades. En particular, se ha demostrado que **ABC294640** disminuye significativamente el crecimiento del tumor *in vivo* en una serie de diferentes modelos de tumores en ratones[75,108–112]. Además, **ABC294640** también parece tener potencial terapéutico para una serie de otras enfermedades, donde se observó una progresión atenuada de la enfermedad en modelos de roedores de osteoartritis[113], artritis reumatoide [114], enfermedad de Crohn[115], colitis ulcerosa[116] y retinopatía diabética[117].

Bioquímicamente, ha sido reportado que **ABC294640** disminuye la S1P y aumenta los niveles de ceramida en las células[74,75], disminuye los niveles plasmáticos de S1P en los ratones[111], inhibe la activación de NF-κB inducida por TNF-α, así como también inhibe la activación de STAT3, AKT y ERK2, y disminuye la expresión de STAT3 y ERK2[74]. Hay informes contradictorios sobre el modo de acción por el cual **ABC294640** induce la

muerte celular, con algunos estudios que demuestran que las vías apoptóticas se activan[75,109] y otros que describen la presencia de marcadores de autofagia[74,118]. La inhibición de SphK2 con **ABC294640** parece tener un potencial terapéutico significativo y, como tal, este compuesto se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de tumores sólidos avanzados.

K145 es otro inhibidor selectivo de SphK2 que actúa de manera competitiva con respecto a la esfingosina, con un Ki de 6,4 μM[119]. **K145** no presentó una inhibición significativa de SphK1 o ceramida quinasa en concentraciones de hasta 10 μM[119]. A 10 μM, **K145** también causó una disminución > 40% en la actividad de CaMKIIβ, y a 4 μM se observó una disminución significativa en fosfo-ERK y fosfo-AKT, lo que implica que **K145** puede funcionar como un inhibidor de doble vía[119]. Los estudios celulares demostraron que a diferencia de SLR080811, **K145** puede inhibir el crecimiento e inducir la apoptosis en células U937 de leucemia humana. Se encontró que **K145** *in vivo* reduce el volumen del tumor en el adenocarcinoma mamario.

SLM6031434[120] es uno de los inhibidores de SphK2 más selectivos junto a **SLC5111312**. Ambos aumentan los niveles de S1P en sangre cuando se administran a ratones, lo que sugiere que SphK2 es el sitio de acción de estas moléculas inhibitorias.

Las estructuras y un pequeño resumen de todos los compuestos nombrados anteriormente se describen en la Figura 7 y en la Tabla 1, respectivamente.

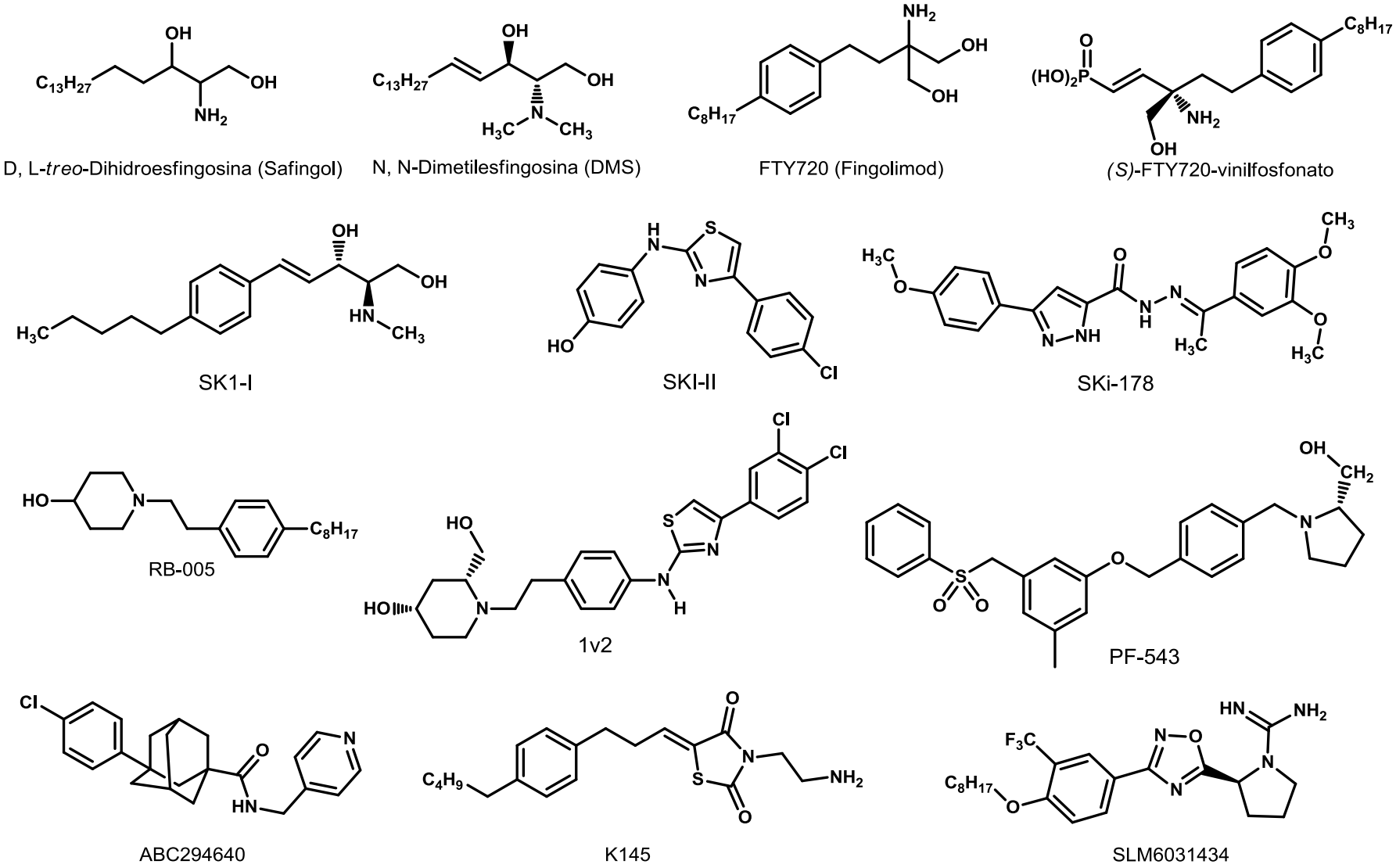


Fig. 7. Estructura de los inhibidores más conocidos para SphKs.

Tabla 1. Propiedades de los inhibidores más conocidos para SphK1 y SphK2

Inhibidor	Quinasa Inhibida	Ki (μM)	Tipo de Inhibición	Tipo de Cáncer	Comentarios	Ref.
D, L-*treo*-DHS	SphK1	3-6	Competitivo	Fase I con cisplatino en tumores sólidos avanzados	Afecta otras quinasas, PKC, sustrato para SphK2	88,92,93
DMS	SphK1 SphK2	5 12	Competitivo No competitivo	Cáncer de mama, pulmón, colon, gástrico y carcinoma hepatocelular.	Carece de especificidad, inhibe CK, PKC y MAPK. Activa P13K, SDK1 y EGFR.	89
FTY720	SphK1	2	Competitivo		Sustrato para SphK2. Induce degradación proteosomal de SphK1.	90,95,96 97
(S)-FYT720-vinil-Pn	SphK1	15	No Competitivo		Induce degradación proteosomal de SphK1.	90
SK1-I	SphK1	9.8	Competitivo	Cáncer de mama, colon, glioblastoma, leucemia,	No determinada.	91
SKI-178	SphK1	1.3	Competitivo		Modificación de SKi-I.	101
SKI-II	SphK1 SphK2	17 50	Mezcla		Falta de especificidad, induce proteólisis de SphK1	99,105
RB-005	SphK1	3,6*	Competitivo		Induce degradación proteasomal de SphK1 en células de músculo liso arterial pulmonar humano.	102
1v2	SphK1	0,02*	Competitivo		Afecta la viabilidad celular a altas concentraciones.	104
PF-543	SphK1	0,0043	Competitivo	Cáncer de mama, colon, colonrectal, leucemia	Induce degradación proteasomal de SphK1. No tiene efectos en la proliferación celular.	100,106
ABC294640	SphK2	9,8	Competitivo	Cáncer hepático, mama (ER+, ER−), páncreas, vejiga, próstata, colonrectal y ovarios.	Produce efectos antagónicos en ERα y degradación proteosomal de SphK1.	75
K145	SphK2	6,4	Competitivo	Leucemia, cáncer de mama.	Inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis en células U937	119
SLM6031434	SphK1 SphK2	20** 0,4**	Competitivo		Disminuye los niveles de S1P y aumenta SPH en células U937 de manera dosis-dependiente.	120

*Valores correspondientes a IC_{50}.

** Valores correspondientes a IC_{50} en ratón.

1.7. Obtención y diseño de fármacos

El descubrimiento de un nuevo medicamento y desarrollo posterior del mismo, son dos fases, que se condicionan para lograr un nuevo producto que sea útil en la terapéutica.

El descubrimiento debe ser diferenciado del desarrollo. Se ha acordado de manera general que el descubrimiento comprende toda la fase que permita asegurar que el compuesto tiene un perfil de actividad deseable. Comprende desde la síntesis, el aislamiento de la fuente natural, o la obtención biotecnológica y toda la fase preclínica, incluida la toxicología; de manera tal que nos confirmen que el compuesto es aceptable en cuanto a eficacia y seguridad para su ensayo en seres humanos. Comprende en un sentido más amplio, un gran conjunto de actos que culminan en la utilización terapéutica de un nuevo medicamento.

Esta fase de descubrimiento, o sea desde la obtención hasta la primera aplicación en humanos, se estima que dure aproximadamente 42,6 meses (3,55 años) como promedio, en aquellos países y transnacionales farmacéuticas con una amplia infraestructura investigativa. En países con un nivel menor de desarrollo esta fase alcanza aproximadamente unos 5-6 años.

La fase de desarrollo comprende la de los estudios clínicos y la del registro farmacéutico, y se estima que duren entre 68.6 meses y 30.3 meses respectivamente.

Todo este largo proceso, desde su obtención hasta su registro comprende un total de 11,8 años de investigación, con un costo promedio de 231 millones de dólares por cada nuevo medicamento que salga al mercado.

Lo más alarmante es que sólo una de cada 10.000 moléculas ensayadas pasa a la fase de desarrollo, una de cada 100.000 supera los ensayos clínicos y logra registrarse y sólo 3 de cada 10 nuevos medicamentos registrados recupera su inversión inicial. Esto genera una triste realidad, por cada millón de moléculas que se inician en esta larga cadena para la obtención de un nuevo medicamento, sólo tres recuperan la inversión inicial. Por tal motivo el diseño racional de fármacos, constituye una herramienta casi indispensable en el desarrollo actual de nuevos medicamentos, contribuyendo a un aumento de las posibilidades de éxitos y a un decrecimiento de los costos.

Si se conoce la base biológica de una enfermedad o de un desarreglo metabólico, es posible diseñar un medicamento utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico. Cuando se conoce este proceso en su base molecular y se pueden definir las moléculas implicadas en el mismo, es posible diseñar medicamentos que interactúen con la molécula responsable, de tal forma que la modifique y se modifique así mismo la patología.

Lo primero, sería definir la base molecular del proceso patológico, para lo cual es preciso conocer los diversos pasos implicados en un proceso fisiológico, que conlleva la realización de una función normal y el conocimiento de qué paso, exactamente, es el que está alterado, en la situación patológica.

Para conocer a profundidad el proceso fisiológico, es necesario conocer la estructura tridimensional de la(s) molécula(s) objetivo, esto es pocas veces posible, sobre todo por la dificultad de obtener los receptores en estados cristalinos. Los métodos más utilizados en este sentido son la Resonancia Magnética Nuclear, la cristalografía de rayos X y los cálculos teóricos de las fuerzas que mantienen la configuración de un sistema, ya sea por mecánica molecular o mecánica cuántica.

1.7.1. Diseño racional de drogas

El diseño de drogas comienza con la identificación de compuestos con una determinada actividad biológica. Posteriormente, se concibe una hipótesis que sugiera cuales son los rasgos químicos relacionados con la bioactividad. Esta hipótesis es evaluada sintetizando y ensayando los compuestos con un "test" biológico apropiado. Sobre la base del análisis de los resultados biológicos, el químico puede modificar la hipótesis original y, luego, repetir el proceso si es necesario[121].

Una tarea fundamental en el desarrollo de nuevos compuestos es deducir un *patrón farmacofórico*. Es decir, un conjunto de átomos o funciones químicas en una determinada orientación, esencial para el reconocimiento de un receptor específico y, por ende, responsables de una respuesta farmacológica. El conocimiento del patrón farmacofórico puede ser subsecuentemente utilizado para buscar nuevos compuestos.

A continuación se analizan dos grandes etapas que comprende el desarrollo de un nuevo fármaco.

Obtención de un compuesto "líder".

Uno de los puntos centrales del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es la selección de compuestos líderes o cabezas de serie con actividad sobre una diana terapéutica que, aunque no hayan sido optimizados aún, presentan propiedades que les permiten convertirse en precursor de un fármaco[122]. Los compuestos líderes pueden tener una gran variedad de orígenes diferentes: fuentes naturales, síntesis, investigación en bases de datos o bibliotecas de compuestos, fuentes etnofarmacológicas, etc.

Se pueden obtener compuestos líderes utilizando diversas estrategias[123]. Dentro de las principales podemos citar:

- *Modificación estructural y mejoras de moléculas ya existentes.*

El objetivo es preparar nuevas moléculas por modificación química de un principio activo conocido. Los nuevos compuestos pueden resultar más potentes, más específicos, más seguros o pueden tener una formulación más fácil de manipular para los médicos y enfermeros o más aceptables para el paciente. Esta estrategia reviste particular interés para la industria farmacéutica debido a factores económicos y competitivos.

- *Búsqueda sistemática en grupos de compuestos elegidos arbitrariamente para determinados ensayos biológicos.*

Este método consiste en realizar un barrido de pruebas buscando nuevas moléculas, ya sea de origen natural o sintético, sin tener en cuenta una hipótesis sobre su potencial terapéutico o farmacológico.

- *Búsqueda utilizando información biológica.*

Corresponde a nuevos descubrimientos hechos en Biología y Medicina o a observaciones fortuitas.

Estudio de distintas modificaciones químicas para mejorar la eficiencia de la estructura líder.

Una vez encontrado y definido el compuesto líder es necesaria la exploración de una serie de derivados obtenidos a partir de variaciones estructurales con el fin de encontrar un producto con mejores propiedades: superior actividad, mejor biodisponibilidad, menor toxicidad y mínimas reacciones secundarias. En la actualidad la mayoría de los fármacos disponibles comercialmente no corresponden a estructuras líderes, sino que surgieron a partir de modificaciones estructurales de estos compuestos mediante estrategias de química medicinal.

Son numerosas las tácticas empleadas para aumentar la eficiencia del compuesto líder. Entre ellas podemos destacar:

- *Sustitución Isostérica.*

Implica la sustitución de átomos o grupos con igual distribución electrónica en la última capa e igual deslocalización del orbital. En general, el término isosterismo se aplica para todo el conjunto de analogías que se pueden establecer entre dos agrupaciones atómicas, incluyendo tanto elementos estéricos como electrónicos y, en general, todas aquellas que sirvan para definir la estructura de una molécula.

- *Modulación Molecular.*

Esta técnica consiste en realizar modificaciones en la longitud de las cadenas carbonadas o en la posición que ocupan los diferentes sustituyentes y en la introducción o eliminación de diferentes grupos

funcionales en la estructura de partida. Existen tres tipos diferentes de situaciones:

- ✓ *Modulación.* Comprende isomerización, homología, alquilación, ramificación, desalquilación, introducción/eliminación de dobles enlaces, cambio en la posición de la insaturación, cambios de posición u orientación de ciertos grupos, sustitución o eliminación de heteroátomos, apertura o cierre de anillos, etc.
- ✓ *Simplificación.* En ocasiones, la molécula se rompe en un intento de encontrar qué partes son responsables de la actividad biológica. Con este fin se diseñan compuestos más sencillos, que contengan aisladamente las partes mencionadas.
- ✓ *Unión de elementos activos.* Se trata de unir a una molécula determinada, restos que han demostrado ser activos en otros compuestos.

En el presente trabajo de tesis, se tratarán los aspectos químicos y estructurales de diferentes series de compuestos de interés en química medicinal y cómo éstos influyen en la actividad biológica, específicamente como inhibidores de SphK. Para el estudio de estos compuestos se utilizaron las técnicas antes mencionadas, las cuales serán desarrolladas con mayor detenimiento en cada capítulo.

1.8. Objetivos Generales

Este plan de trabajo tiene dos objetivos generales. El primero es obtener, mediante estudios de modelado molecular, datos estructurales característicos del sitio catalítico de la enzima SphK1, que permitan entender a nivel molecular, las particularidades del sitio activo de esta enzima que juega un rol central en diversos procesos fisiológicos que incluyen la inflamación y el cáncer entre otros.

El otro objetivo general es la obtención de nuevos inhibidores para esta enzima, de pequeño tamaño molecular, que puedan actuar como potenciales agentes anticancerígenos y antinflamatorios.

Objetivos Específicos

Los principales objetivos específicos de este trabajo son:

- Realizar estudios de modelado molecular (empleando simulaciones de dinámica molecular (DM)) de la enzima SphK1 con sus respectivos ligandos endógenos y/o inhibidores conocidos.
- Realizar un estudio de docking flexible en el sitio catalítico de esta enzima.

- Simular las interacciones moleculares que determinan la formación de los complejos ligando-receptor mediante el empleo del método de Interacción de Energía Lineal (empleando cálculos de dinámica molecular).
- Generar sistemas de modelos reducidos que contemplen el sitio activo de SphK1.
- Utilizar estos modelos reducidos para realizar estudios mecano-cuánticos (MC) para los distintos complejos ligando-enzima con el objeto de obtener datos termodinámicos y energías de interacción más confiables.
- Explorar sitios alternativos de interacción en el bolsillo de unión de la enzima.
- En base de la aproximación del espacio químico (ligando parcial) y sobre la base de los resultados anteriores, proponer nuevos potenciales inhibidores de SphK1.
- Tomando los compuestos propuestos, realizar un cribado virtual para seleccionar los mejores candidatos en función de las energías de interacción.
- Proponer y sintetizar nuevas estructuras.
- Evaluar biológicamente las estructuras sintetizadas mediante ensayos de actividad de SphK1 y ensayos de proliferación en líneas celulares tumorales.

1.9. Referencias

(1) Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Chapter 1 - General Aspects of Cancer Chemotherapy; Avendaño, C., Menéndez, J. C. B. T.-M. C. of A. D. (Second E., Eds.; Elsevier: Boston, 2015; pp 1–22.

(2) Ponder, B. A. Cancer Genetics. *Nature* **2001**, *411* (6835), 336–341.

(3) Punt, C. J. A.; Koopman, M.; Vermeulen, L. From Tumour Heterogeneity to Advances in Precision Treatment of Colorectal Cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14* (4), 235–246.

(4) You, J. S.; Jones, P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell* **2012**, *22* (1), 9–20.

(5) Stoeltzing, O.; Meric-Bernstam, F.; Ellis, L. M. Intracellular Signaling in Tumor and Endothelial Cells: The Expected And, yet Again, the Unexpected. *Cancer Cell* **2006**, *10* (2), 89–91.

(6) Gill, H.; Leung, A. Y. H.; Kwong, Y.-L. Molecularly Targeted Therapy in Acute Myeloid Leukemia. *Future Oncol.* **2016**, *12* (6), 827–838.

(7) Zhang, H. Three Generations of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Developed to Revolutionize the Therapy of Lung Cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 3867–3872.

(8) Kaur, R.; Dwivedi, A. R.; Kumar, B.; Kumar, V. Recent Developments on 1,2,4-Triazole Nucleus in Anticancer Compounds: A Review. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2016**, *16* (4), 465–489.

(9) Wu, J.; Fu, Z.; Yan, F.; Ju, H. Biomedical and Clinical Applications of Immunoassays and Immunosensors for Tumor Markers. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26* (7), 679–688.

(10) Ullah, M. F.; Aatif, M. The Footprints of Cancer Development: Cancer Biomarkers. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35* (3), 193–200.

(11) Tothill, I. E. Biosensors for Cancer Markers Diagnosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, *20* (1), 55–62.

(12) Rasooly, A.; Jacobson, J. Development of Biosensors for Cancer Clinical Testing. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21* (10), 1851–1858.

(13) Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*; Elsevier Science, 2015.

(14) Krebs, E. G.; Beavo, J. A. Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 923–959.

(15) Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2271–2290.

(16) Consortium, U. Update on Activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (Database issue), D43-7.

(17) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten Things You Should Know about Protein Kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (11), 2675–2700.

(18) Tong, M.; Seeliger, M. A. Targeting Conformational Plasticity of Protein Kinases. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 190–200.

(19) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (7), 422–439.

(20) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (1), 28–39.

(21) Bharate, S. B.; Sawant, S. D.; Singh, P. P.; Vishwakarma, R. A. Kinase Inhibitors of Marine Origin. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6761–6815.

(22) Ipatova, O. M.; Torkhovskaya, T. I.; Zakharova, T. S.; Khalilov, E. M. Sphingolipids and Cell Signaling: Involvement in Apoptosis and Atherogenesis. *Biochemistry. (Mosc).* **2006**, *71* (7), 713–722.

(23) Ricci, C.; Onida, F.; Ghidoni, R. Sphingolipid Players in the Leukemia Arena. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (12), 2121–2132.

(24) Cuvillier, O. Sphingosine in Apoptosis Signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585* (2–3), 153–162.

(25) Zheng, W.; Kollmeyer, J.; Symolon, H.; Momin, A.; Munter, E.; Wang, E.; Kelly, S.; Allegood, J. C.; Liu, Y.; Peng, Q.; Ramaraju, H.; Sullards, M. C.; Cabot, M.; Merrill, A. H. J. Ceramides and Other Bioactive Sphingolipid Backbones in Health and Disease: Lipidomic Analysis, Metabolism and Roles in Membrane Structure, Dynamics, Signaling and Autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (12), 1864–1884.

(26) Selvam, S. P.; Ogretmen, B. Sphingosine Kinase/sphingosine 1-Phosphate Signaling in Cancer Therapeutics and Drug Resistance. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2013**, No. 216, 3–27.

(27) Yatomi, Y.; Igarashi, Y.; Yang, L.; Hisano, N.; Qi, R.; Asazuma, N.; Satoh, K.; Ozaki, Y.; Kume, S. Sphingosine 1-Phosphate, a Bioactive Sphingolipid Abundantly Stored in Platelets, Is a Normal Constituent of Human Plasma and Serum. *J. Biochem.* **1997**, *121* (5), 969–973.

(28) Argraves, K. M.; Argraves, W. S. HDL Serves as a S1P Signaling Platform Mediating a Multitude of Cardiovascular Effects. *J. Lipid Res.* **2007**, *48* (11), 2325–2333.

(29) Mendelson, K.; Evans, T.; Hla, T. Sphingosine 1-Phosphate Signalling. *Development* **2014**, *141* (1), 5–9.

(30) Pappu, R.; Schwab, S. R.; Cornelissen, I.; Pereira, J. P.; Regard, J. B.; Xu, Y.; Camerer, E.; Zheng, Y.-W.; Huang, Y.; Cyster, J. G.; Coughlin, S. R. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **2007**, *316* (5822), 295–298.

(31) Pyne, N. J.; Pyne, S. Sphingosine 1-Phosphate and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 489–503.

(32) Rodriguez, Y. I.; Campos, L. E.; Castro, M. G.; Aladhami, A.; Oskeritzian, C. A.; Alvarez, S. E. Sphingosine-1 Phosphate: A New Modulator of Immune Plasticity in the Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, 218.

(33) Alvarez, S. E.; Milstien, S.; Spiegel, S. Autocrine and Paracrine Roles of Sphingosine-1-Phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* **2007**, *18* (8), 300–307.

(34) Nijnik, A.; Clare, S.; Hale, C.; Chen, J.; Raisen, C.; Mottram, L.; Lucas, M.; Estabel, J.; Ryder, E.; Adissu, H.; Adams, N. C.; Ramirez-Solis, R.; White, J. K.; Steel, K. P.; Dougan, G.; Hancock, R. E. W. The Role of Sphingosine-1-Phosphate Transporter Spns2 in Immune System Function. *J. Immunol.* **2012**, *189* (1), 102–111.

(35) Mitra, P.; Oskeritzian, C. A.; Payne, S. G.; Beaven, M. A.; Milstien, S.; Spiegel, S. Role of ABCC1 in Export of Sphingosine-1-Phosphate from Mast Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (44), 16394–16399.

(36) Kihara, Y.; Maceyka, M.; Spiegel, S.; Chun, J. Lysophospholipid Receptor Nomenclature Review: IUPHAR Review 8. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (15), 3575–

3594.

(37) Spiegel, S.; Milstien, S. The Outs and the Ins of Sphingosine-1-Phosphate in Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 403–415.

(38) Alvarez, S. E.; Harikumar, K. B.; Hait, N. C.; Allegood, J.; Strub, G. M.; Kim, E. Y.; Maceyka, M.; Jiang, H.; Luo, C.; Kordula, T.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine-1-Phosphate Is a Missing Cofactor for the E3 Ubiquitin Ligase TRAF2. *Nature* **2010**, *465*, 1084–1088.

(39) Pitson, S. M.; Xia, P.; Leclercq, T. M.; Moretti, P. A. B.; Zebol, J. R.; Lynn, H. E.; Wattenberg, B. W.; Vadas, M. A. Phosphorylation-Dependent Translocation of Sphingosine Kinase to the Plasma Membrane Drives Its Oncogenic Signalling. *J. Exp. Med.* **2005**, *201* (1), 49–54.

(40) Jarman, K. E.; Moretti, P. A. B.; Zebol, J. R.; Pitson, S. M. Translocation of Sphingosine Kinase 1 to the Plasma Membrane Is Mediated by Calcium- and Integrin-Binding Protein 1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (1), 483–492.

(41) Neubauer, H. A.; Pitson, S. M. Roles, Regulation and Inhibitors of Sphingosine Kinase 2. *FEBS J.* **2013**, *280* (21), 5317–5336.

(42) Hait, N. C.; Bellamy, A.; Milstien, S.; Kordula, T.; Spiegel, S. Sphingosine Kinase Type 2 Activation by ERK-Mediated Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (16), 12058–12065.

(43) Maceyka, M.; Harikumar, K. B.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine-1-Phosphate Signaling and Its Role in Disease. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22* (1), 50–60.

(44) Snider, A. J.; Orr Gandy, K. A.; Obeid, L. M. Sphingosine Kinase: Role in Regulation of Bioactive Sphingolipid Mediators in Inflammation. *Biochimie* **2010**, *92* (6), 707–715.

(45) Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L.; Cyster, J. G. Lymphocyte Egress from Thymus and Peripheral Lymphoid Organs Is Dependent on S1P Receptor 1. *Nature* **2004**, *427* (6972), 355–360.

(46) Kono, M.; Allende, M. L.; Proia, R. L. Sphingosine-1-Phosphate Regulation of Mammalian Development. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1781* (9), 435–441.

(47) Pelletier, D.; Hafler, D. A. Fingolimod for Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366* (4), 339–347.

(48) Maceyka, M.; Alvarez, S. E.; Milstien, S.; Spiegel, S. Filamin A Links Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 at Lamellipodia to Orchestrate Cell Migration. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (18), 5687–5697.

(49) Shida, D.; Fang, X.; Kordula, T.; Takabe, K.; Lépine, S.; Alvarez, S. E.; Milstien, S.; Spiegel, S. Cross-Talk between LPA1 and Epidermal Growth Factor Receptors Mediates Up-Regulation of Sphingosine Kinase 1 to Promote Gastric Cancer Cell Motility and Invasion. *Cancer Res.* **2008**, *68* (16), 6569–6577.

(50) Long, J. S.; Edwards, J.; Watson, C.; Tovey, S.; Mair, K. M.; Schiff, R.; Natarajan, V.; Pyne, N. J.; Pyne, S. Sphingosine Kinase 1 Induces Tolerance to Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Prevents Formation of a Migratory Phenotype in Response to Sphingosine 1-Phosphate in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30* (15), 3827–3841.

(51) Kluk, M. J.; Ryan, K. P.; Wang, B.; Zhang, G.; Rodig, S. J.; Sanchez, T. Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 in Classical Hodgkin Lymphoma: Assessment of Expression and Role in Cell Migration. *Lab. Invest.* **2013**, *93* (4), 462–471.

(52) Goparaju, S. K.; Jolly, P. S.; Watterson, K. R.; Bektas, M.; Alvarez, S.; Sarkar, S.; Mel, L.; Ishii, I.; Chun, J.; Milstien, S.; Spiegel, S. The S1P2 Receptor Negatively Regulates Platelet-Derived Growth Factor-Induced Motility and Proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25* (10), 4237–4249.

(53) Malchinkhuu, E.; Sato, K.; Maehama, T.; Mogi, C.; Tomura, H.; Ishiuchi, S.; Yoshimoto, Y.; Kurose, H.; Okajima, F. S1P(2) Receptors Mediate Inhibition of Glioma Cell Migration through Rho Signaling Pathways Independent of PTEN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366* (4), 963–968.

(54) Hyder, C. L.; Kemppainen, K.; Isoniemi, K. O.; Imanishi, S. Y.; Goto, H.; Inagaki, M.; Fazeli, E.; Eriksson, J. E.; Törnquist, K. Sphingolipids Inhibit Vimentin-Dependent Cell Migration. *J. Cell Sci.* **2015**.

(55) Arikawa, K.; Takuwa, N.; Yamaguchi, H.; Sugimoto, N.; Kitayama, J.; Nagawa, H.; Takehara, K.; Takuwa, Y. Ligand-Dependent Inhibition of B16 Melanoma Cell Migration and Invasion via Endogenous S1P2 G Protein-Coupled Receptor. Requirement of Inhibition of Cellular RAC Activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (35), 32841–32851.

(56) Miller, A. V; Alvarez, S. E.; Spiegel, S.; Lebman, D. A. Sphingosine Kinases and Sphingosine-1-Phosphate Are Critical for Transforming Growth Factor Beta-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation and Promotion of Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (12), 4142–4151.

(57) Liu, R.; Zhao, R.; Zhou, X.; Liang, X.; Campbell, D. J. W.; Zhang, X.; Zhang, L.; Shi, R.; Wang, G.; Pandak, W. M.; Sirica, A. E.; Hylemon, P. B.; Zhou, H. Conjugated Bile Acids Promote Cholangiocarcinoma Cell Invasive Growth through Activation of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2. *Hepatology* **2014**, *60* (3), 908–918.

(58) Kong, Y.; Wang, H.; Lin, T.; Wang, S. Sphingosine-1-phosphate/S1P Receptors Signaling Modulates Cell Migration in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 565369.

(59) Dolezalova, H.; Shankar, G.; Huang, M.-C.; Bikle, D. D.; Goetzl, E. J. Biochemical Regulation of Breast Cancer Cell Expression of S1P2 (Edg-5) and S1P3 (Edg-3) G Protein-Coupled Receptors for Sphingosine 1-Phosphate. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88* (4), 732–743.

(60) Wang, H.; Cai, K.-Y.; Li, W.; Huang, H. Sphingosine-1-Phosphate Induces the Migration and Angiogenesis of Epcs Through the Akt Signaling Pathway via Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3/Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Beta. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2015**, *20* (4), 597–611.

(61) Yamashita, H.; Kitayama, J.; Shida, D.; Yamaguchi, H.; Mori, K.; Osada, M.; Aoki, S.; Yatomi, Y.; Takuwa, Y.; Nagawa, H. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Expression Profile in Human Gastric Cancer Cells: Differential Regulation on the Migration and Proliferation. *J. Surg. Res.* **2006**, *130* (1), 80–87.

(62) Allende, M. L.; Bektas, M.; Lee, B. G.; Bonifacino, E.; Kang, J.; Tuymetova, G.; Chen, W.; Saba, J. D.; Proia, R. L. Sphingosine-1-Phosphate Lyase Deficiency Produces a pro-Inflammatory Response While Impairing Neutrophil Trafficking. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (9), 7348–7358.

(63) Dillmann, C.; Mora, J.; Olesch, C.; Brune, B.; Weigert, A. S1PR4 Is Required for Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *Biol. Chem.* **2015**, *396* (6–7), 775–782.

(64) Mayol, K.; Biajoux, V.; Marvel, J.; Balabanian, K.; Walzer, T. Sequential Desensitization of CXCR4 and S1P5 Controls Natural Killer Cell Trafficking. *Blood* **2011**, *118* (18), 4863–4871.

(65) Jenne, C. N.; Enders, A.; Rivera, R.; Watson, S. R.; Bankovich, A. J.; Pereira, J. P.; Xu, Y.; Roots, C. M.; Beilke, J. N.; Banerjee, A.; Reiner, S. L.; Miller, S. A.; Weinmann, A. S.; Goodnow, C. C.; Lanier, L. L.; Cyster, J. G.; Chun, J. T-Bet-Dependent S1P5 Expression in NK Cells Promotes Egress from Lymph Nodes and Bone Marrow. *J. Exp. Med.* **2009**, *206* (11), 2469–2481.

(66) Hait, N. C.; Allegood, J.; Maceyka, M.; Strub, G. M.; Harikumar, K. B.; Singh, S. K.; Luo, C.; Marmorstein, R.; Kordula, T.; Milstien, S.; Spiegel, S. Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **2009**, *325* (5945), 1254–1257.

(67) Strub, G. M.; Paillard, M.; Liang, J.; Gomez, L.; Allegood, J. C.; Hait, N. C.; Maceyka, M.; Price, M. M.; Chen, Q.; Simpson, D. C.; Kordula, T.; Milstien, S.; Lesnefsky, E. J.; Spiegel, S. Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 in Mitochondria Interacts with Prohibitin 2 to Regulate Complex IV Assembly and Respiration. *FASEB J.* **2011**, *25* (2), 600–612.

(68) Parham, K. A.; Zebol, J. R.; Tooley, K. L.; Sun, W. Y.; Moldenhauer, L. M.; Cockshell, M. P.; Gliddon, B. L.; Moretti, P. A.; Tigyi, G.; Pitson, S. M.; Bonder, C. S. Sphingosine 1-Phosphate Is a Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma That Regulates Neoangiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2015**, *29* (9), 3638–3653.

(69) Liu, H.; Sugiura, M.; Nava, V. E.; Edsall, L. C.; Kono, K.; Poulton, S.; Milstien, S.; Kohama, T.; Spiegel, S. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoform. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (26), 19513–19520.

(70) Leclercq, T. M.; Pitson, S. M. Cellular Signalling by Sphingosine Kinase and Sphingosine 1-Phosphate. *IUBMB Life* **2006**, *58* (8), 467–472.

(71) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.-H.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; Thibault, S.; Walker, N. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(72) Adams, D. R.; Pyne, S.; Pyne, N. J. Sphingosine Kinases: Emerging Structure-Function Insights. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41* (5), 395–409.

(73) Pitson, S. M. Regulation of Sphingosine Kinase and Sphingolipid Signaling. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36* (2), 97–107.

(74) Gao, P.; Peterson, Y. K.; Smith, R. A.; Smith, C. D. Characterization of Isoenzyme-Selective Inhibitors of Human Sphingosine Kinases. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e44543.

(75) French, K. J.; Zhuang, Y.; Maines, L. W.; Gao, P.; Wang, W.; Beljanski, V.; Upson, J. J.; Green, C. L.; Keller, S. N.; Smith, C. D. Pharmacology and Antitumor Activity of ABC294640, a Selective Inhibitor of Sphingosine Kinase-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333* (1), 129–139.

(76) Maceyka, M.; Sankala, H.; Hait, N. C.; Le Stunff, H.; Liu, H.; Toman, R.; Collier, C.; Zhang, M.; Satin, L. S.; Merrill, A. H. J.; Milstien, S.; Spiegel, S. SphK1 and SphK2, Sphingosine Kinase Isoenzymes with Opposing Functions in Sphingolipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (44), 37118–37129.

(77) Pitson, S. M.; Moretti, P. A.; Zebol, J. R.; Xia, P.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A.; D'Andrea, R. J.; Wattenberg, B. W. Expression of a Catalytically Inactive Sphingosine Kinase Mutant Blocks Agonist-Induced Sphingosine Kinase Activation. A Dominant-Negative Sphingosine Kinase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (43), 33945–33950.

(78) Pitson, S. M.; Moretti, P. A. B.; Zebol, J. R.; Zareie, R.; Derian, C. K.; Darrow, A. L.; Qi, J.; D'Andrea, R. J.; Bagley, C. J.; Vadas, M. A.; Wattenberg, B. W. The Nucleotide-

Binding Site of Human Sphingosine Kinase 1. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (51), 49545–49553.

(79) Pulkoski-Gross, M. J.; Donaldson, J. C.; Obeid, L. M. Sphingosine-1-Phosphate Metabolism: A Structural Perspective. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *50* (4), 298–313.

(80) Taha, T. A.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Sphingosine Kinase: Biochemical and Cellular Regulation and Role in Disease. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *39* (2), 113–131.

(81) Yokota, S.; Taniguchi, Y.; Kihara, A.; Mitsutake, S.; Igarashi, Y. Asp177 in C4 Domain of Mouse Sphingosine Kinase 1a Is Important for the Sphingosine Recognition. *FEBS Lett.* **2004**, *578* (1), 106–110.

(82) Alshaker, H.; Sauer, L.; Monteil, D.; Ottaviani, S.; Srivats, S.; B??hler, T.; Pchejetski, D. Therapeutic Potential of Targeting SK1 in Human Cancers. *Adv. Cancer Res.* **2013**, *117*, 143–200.

(83) Pan, J.; Tao, Y.-F.; Zhou, Z.; Cao, B.; Wu, S.-Y.; Zhang, Y.-L.; Hu, S.-Y.; Zhao, W.-L.; Wang, J.; Lou, G.-L.; Li, Z.; Feng, X.; Ni, J. An Novel Role of Sphingosine Kinase-1 (SPHK1) in the Invasion and Metastasis of Esophageal Carcinoma. *Journal of Translational Medicine*. 2011, p 157.

(84) Pyne, N. J.; Tonelli, F.; Lim, K. G.; Long, J.; Edwards, J.; Pyne, S. Targeting Sphingosine Kinase 1 in Cancer. *Adv. Biol. Regul.* **2012**, *52* (1), 31–38.

(85) Pyne, N. J.; Tonelli, F.; Lim, K. G.; Long, J. S.; Edwards, J.; Pyne, S. Sphingosine 1-Phosphate Signalling in Cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (1), 94–100.

(86) Tamashiro, P. M.; Furuya, H.; Shimizu, Y.; Iino, K.; Kawamori, T. The Impact of Sphingosine Kinase-1 in Head and Neck Cancer. *Biomolecules* **2013**, *3* (3), 481–513.

(87) Campos, L. S.; Rodriguez, Y. I.; Leopoldino, A. M.; Hait, N. C.; Lopez Bergami, P.; Castro, M. G.; Sanchez, E. S.; Maceyka, M.; Spiegel, S.; Alvarez, S. E. Filamin A Expression Negatively Regulates Sphingosine-1-Phosphate-Induced NF-kappaB Activation in Melanoma Cells by Inhibition of Akt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2016**, *36* (2), 320–329.

(88) Buehrer, B. M.; Bell, R. M. Inhibition of Sphingosine Kinase in Vitro and in Platelets. Implications for Signal Transduction Pathways. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (5), 3154–3159.

(89) Igarashi, Y.; Hakomori, S. Enzymatic Synthesis of N,N-Dimethyl-Sphingosine: Demonstration of the Sphingosine: N-Methyltransferase in Mouse Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164* (3), 1411–1416.

(90) Tonelli, F.; Lim, K. G.; Loveridge, C.; Long, J.; Pitson, S. M.; Tigyi, G.; Bittman, R.; Pyne, S.; Pyne, N. J. FTY720 and (S)-FTY720 Vinylphosphonate Inhibit Sphingosine Kinase 1 and Promote Its Proteasomal Degradation in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle, Breast Cancer and Androgen-Independent Prostate Cancer Cells. *Cell. Signal.* **2010**, *22* (10), 1536–1542.

(91) Paugh, S. W.; Paugh, B. S.; Rahmani, M.; Kapitonov, D.; Almenara, J. A.; Kordula, T.; Milstien, S.; Adams, J. K.; Zipkin, R. E.; Grant, S.; Spiegel, S. A Selective Sphingosine Kinase 1 Inhibitor Integrates Multiple Molecular Therapeutic Targets in Human Leukemia. *Blood* **2008**, *112* (4), 1382–1391.

(92) Coward, J.; Ambrosini, G.; Musi, E.; Truman, J.-P.; Haimovitz-Friedman, A.; Allegood, J. C.; Wang, E.; Merrill, A. H. J.; Schwartz, G. K. Safingol (L-Threo-Sphinganine) Induces Autophagy in Solid Tumor Cells through Inhibition of PKC and the PI3-Kinase Pathway. *Autophagy* **2009**, *5* (2), 184–193.

(93) Dickson, M. A.; Carvajal, R. D.; Merrill, A. H. J.; Gonen, M.; Cane, L. M.; Schwartz, G. K. A Phase I Clinical Trial of Safingol in Combination with Cisplatin in Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (8), 2484–2492.

(94) Sugiura, M.; Kono, K.; Liu, H.; Shimizugawa, T.; Minekura, H.; Spiegel, S.; Kohama, T. Ceramide Kinase, a Novel Lipid Kinase. Molecular Cloning and Functional Characterization. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (26), 23294–23300.

(95) Graler, M. H.; Goetzl, E. J. The Immunosuppressant FTY720 down-Regulates Sphingosine 1-Phosphate G-Protein-Coupled Receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2004**, *18* (3), 551–553.

(96) Oo, M. L.; Thangada, S.; Wu, M.-T.; Liu, C. H.; Macdonald, T. L.; Lynch, K. R.; Lin, C.-Y.; Hla, T. Immunosuppressive and Anti-Angiogenic Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 Agonists Induce Ubiquitinylation and Proteasomal Degradation of the Receptor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (12), 9082–9089.

(97) Willis, M. A.; Cohen, J. A. Fingolimod Therapy for Multiple Sclerosis. *Semin. Neurol.* **2013**, *33* (1), 37–44.

(98) Lim, K. G.; Tonelli, F.; Li, Z.; Lu, X.; Bittman, R.; Pyne, S.; Pyne, N. J. FTY720 Analogues as Sphingosine Kinase 1 Inhibitors: Enzyme Inhibition Kinetics, Allosterism, Proteasomal Degradation, and Actin Rearrangement in MCF-7 Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18633–18640.

(99) French, K. J.; Schrecengost, R. S.; Lee, B. D.; Zhuang, Y.; Smith, S. N.; Eberly, J. L.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5962–5969.

(100) Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Kasten, T.; Yates, M.; Jerome, G.; Rains, J. W.; Hall, T.; Chrencik, J.; Kraus, M.; Cronin, C. N.; Saabye, M.; Highkin, M. K.; Broadus, R.; Ogawa, S.; Cukyne, K.; Zawadzke, L. E.; Peterkin, V.; Iyanar, K.; Scholten, J. A.; Wendling, J.; Fujiwara, H.; Nemirovskiy, O.; Wittwer, A. J.; Nagiec, M. M. Modulation of Cellular S1P Levels with a Novel, Potent and Specific Inhibitor of Sphingosine Kinase-1. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), 79–88.

(101) Hengst, J. A.; Wang, X.; Sk, U. H.; Sharma, A. K.; Amin, S.; Yun, J. K. Development of a Sphingosine Kinase 1 Specific Small-Molecule Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7498–7502.

(102) Baek, D. J.; MacRitchie, N.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Bittman, R. Synthesis of Selective Inhibitors of Sphingosine Kinase 1. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (21), 2136–2138.

(103) Baek, D. J.; MacRitchie, N.; Anthony, N. G.; MacKay, S. P.; Pyne, S.; Pyne, N. J.; Bittman, R. Structure-Activity Relationships and Molecular Modeling of Sphingosine Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9310–9327.

(104) Gustin, D. J.; Li, Y.; Brown, M. L.; Min, X.; Schmitt, M. J.; Wanska, M.; Wang, X.; Connors, R.; Johnstone, S.; Cardozo, M.; Cheng, A. C.; Jeffries, S.; Franks, B.; Li, S.; Shen, S.; Wong, M.; Wesche, H.; Xu, G.; Carlson, T. J.; Plant, M.; Morgenstern, K.; Rex, K.; Schmitt, J.; Coxon, A.; Walker, N.; Kayser, F.; Wang, Z. Structure Guided Design of a Series of Sphingosine Kinase (SphK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4608–4616.

(105) French, K. J.; Upson, J. J.; Keller, S. N.; Zhuang, Y.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Antitumor Activity of Sphingosine Kinase Inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318* (2), 596–603.

(106) Lynch, K. R. Building a Better Sphingosine Kinase-1 Inhibitor. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), e1-2.

(107) Taha, T. A.; Kitatani, K.; El-Alwani, M.; Bielawski, J.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M.

Loss of Sphingosine Kinase-1 Activates the Intrinsic Pathway of Programmed Cell Death: Modulation of Sphingolipid Levels and the Induction of Apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2006**, *20* (3), 482–484.

(108) Antoon, J. W.; White, M. D.; Slaughter, E. M.; Driver, J. L.; Khalili, H. S.; Elliott, S.; Smith, C. D.; Burow, M. E.; Beckman, B. S. Targeting NFkB Mediated Breast Cancer Chemoresistance through Selective Inhibition of Sphingosine Kinase-2. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11* (7), 678–689.

(109) Antoon, J. W.; White, M. D.; Driver, J. L.; Burow, M. E.; Beckman, B. S. Sphingosine Kinase Isoforms as a Therapeutic Target in Endocrine Therapy Resistant Luminal and Basal-A Breast Cancer. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **2012**, *237* (7), 832–844.

(110) Beljanski, V.; Knaak, C.; Zhuang, Y.; Smith, C. D. Combined Anticancer Effects of Sphingosine Kinase Inhibitors and Sorafenib. *Invest. New Drugs* **2011**, *29* (6), 1132–1142.

(111) Beljanski, V.; Lewis, C. S.; Smith, C. D. Antitumor Activity of Sphingosine Kinase 2 Inhibitor ABC294640 and Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Xenografts. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11* (5), 524–534.

(112) Chumanevich, A. A.; Poudyal, D.; Cui, X.; Davis, T.; Wood, P. A.; Smith, C. D.; Hofseth, L. J. Suppression of Colitis-Driven Colon Cancer in Mice by a Novel Small Molecule Inhibitor of Sphingosine Kinase. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (10), 1787–1793.

(113) Fitzpatrick, L. R.; Green, C.; Maines, L. W.; Smith, C. D. Experimental Osteoarthritis in Rats Is Attenuated by ABC294640, a Selective Inhibitor of Sphingosine Kinase-2. *Pharmacology* **2011**, *87* (3–4), 135–143.

(114) Fitzpatrick, L. R.; Green, C.; Frauenhoffer, E. E.; French, K. J.; Zhuang, Y.; Maines, L. W.; Upson, J. J.; Paul, E.; Donahue, H.; Mosher, T. J.; Smith, C. D. Attenuation of Arthritis in Rodents by a Novel Orally-Available Inhibitor of Sphingosine Kinase. *Inflammopharmacology* **2011**, *19* (2), 75–87.

(115) Maines, L. W.; Fitzpatrick, L. R.; Green, C. L.; Zhuang, Y.; Smith, C. D. Efficacy of a Novel Sphingosine Kinase Inhibitor in Experimental Crohn's Disease. *Inflammopharmacology* **2010**, *18* (2), 73–85.

(116) Maines, L. W.; Fitzpatrick, L. R.; French, K. J.; Zhuang, Y.; Xia, Z.; Keller, S. N.; Upson, J. J.; Smith, C. D. Suppression of Ulcerative Colitis in Mice by Orally Available Inhibitors of Sphingosine Kinase. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53* (4), 997–1012.

(117) Maines, L. W.; French, K. J.; Wolpert, E. B.; Antonetti, D. A.; Smith, C. D. Pharmacologic Manipulation of Sphingosine Kinase in Retinal Endothelial Cells: Implications for Angiogenic Ocular Diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47* (11), 5022–5031.

(118) Beljanski, V.; Knaak, C.; Smith, C. D. A Novel Sphingosine Kinase Inhibitor Induces Autophagy in Tumor Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333* (2), 454–464.

(119) Liu, K.; Guo, T. L.; Hait, N. C.; Allegood, J.; Parikh, H. I.; Xu, W.; Kellogg, G. E.; Grant, S.; Spiegel, S.; Zhang, S. Biological Characterization of 3-(2-Amino-Ethyl)-5-[3-(4-Butoxyl-Phenyl)-Propylidene]-Thiazolidine-2,4-Dione (K145) as a Selective Sphingosine Kinase-2 Inhibitor and Anticancer Agent. *PLoS One* **2013**, *8* (2), e56471.

(120) Kharel, Y.; Morris, E. A.; Congdon, M. D.; Thorpe, S. B.; Tomsig, J. L.; Santos, W. L.; Lynch, K. R. Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355* (1), 23–31.

(121) Garibotto, F. Búsqueda de Nuevos Compuestos Antifúngicos Naturales Y Sintéticos, Universidad Nacional de San Luis, 2011.

(122) Peláez, F. Paradigmas Actuales En Las Etapas Tempranas Del Proceso de Descubrimiento Y Desarrollo de Nuevos Fármacos. *An. Quim.* **2011**, *107* (1), 36–45.

(123) Wermuth, C. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3rd Editio.; Wermuth, C., Ed.; 2008.

Capítulo 2
Metodología

2.1. Métodos Teóricos

2.1.1. Estudios de docking

Una parte muy importante en el diseño de nuevos compuestos consiste en la búsqueda de modos de unión entre moléculas pequeñas y receptores o macromoléculas blancos. Los distintos programas de docking proveen un protocolo veloz para obtener estos resultados, permitiendo también la visualización de las geometrías obtenidas[1].

Cribado Virtual

El cribado virtual o screning virtual (SV) es una técnica computacional utilizada en el descubrimiento de fármacos para buscar en bibliotecas de pequeñas moléculas con el fin de identificar aquellas estructuras que tienen más probabilidades de unirse a un objetivo farmacológico, generalmente un receptor de proteínas o enzima[2,3].

La preparación del receptor y la configuración del docking se llevaron a cabo con AutoDock Tools[4]. Todas las operaciones que implican la conversión de formato, el filtrado y la manipulación de las moléculas del ligando (incluida la preparación del ligando para el docking) se realizaron con OpenBabel[5]. Los cálculos de docking se realizaron con Autodock Vina[6].

El modelo de regresión logística para filtrar las poses "no similares a rayos X" del conjunto de poses de docking se construyeron dentro del entorno de programación científico de Octave[7].

Para evaluar la performance de nuestro modelo de cribado virtual se realizaron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) utilizando el paquete ROCR[8] del software R[9]. Este tipo de análisis proporciona herramientas para descartar modelos imprecisos. Dicha representación se obtiene al graficar la sensibilidad en el eje de las ordenadas *versus* 1 – especificidad en el eje de las abscisas. La sensibilidad equivale a la relación entre verdaderos positivos y el total de moléculas activas incluidas en el estudio, mientras que 1 – especificidad corresponde a la relación entre falsos positivos y el número total de moléculas inactivas. Para determinar la validez de los modelos, una opción es medir el área bajo la curva (AUC) y compararlo con un valor de discriminación aleatorio (representado en la gráfica por la línea diagonal) igual a 0,5. Un modelo con un valor de AUC mayor que 0,5 indica que el modelo reconoce compuestos activos de inactivos con un poder predictivo mayor al aleatorio. Para definir qué compuestos se consideraron activos y cuáles inactivos, se utilizó la base de

datos CHEMBL[10] de donde se tomaron 54 compuestos con sus respectivos valores de constantes de inhibición (Ki).

En este trabajo de tesis doctoral, se utilizó una biblioteca de compuestos disponibles entre los cuales se encontraban incluidos chalconas, acetogeninas, protoberberinas, nitrosopirimidinas y carbamatos, entre otros.

Docking

Tanto en la proteína como en cada uno de los compuestos analizados, se agregaron cargas Gasteiger[11] y se removieron los hidrógenos no polares. Todos los ángulos torsionales de los ligandos se dejaron rotar libremente durante el estudio de docking.

Se utilizó AutoDock4[4] para realizar los estudios de docking en cada compuesto en el sitio activo de SphK1 utilizando un algoritmo genético lamarckiano con pseudo-Solis y Wets de búsqueda local[12]. Se usaron los siguientes parámetros: el número máximo de generaciones se estableció en $2{,}7 \times 10^4$; el número máximo de evaluaciones de energía fue $25{,}0 \times 10^6$; las dimensiones de la grilla fueron de 46 × 46 × 48 puntos separados por 0,375 Å y centrado en el sitio activo de SphK1. Para cada trabajo de docking, se generaron 200 conformaciones. Todos los demás parámetros de ejecución se mantuvieron en su configuración predeterminada. Las conformaciones resultantes se agruparon en familias considerando los valores de Distancia Media Cuadrática Mínima o Root Mean Square Deviation (RMSD en inglés) obtenidos. La conformación más poblada y de menor energía se consideró como la orientación más favorable[13].

2.1.2. Simulaciones de Dinámica Molecular

En una simulación de dinámica molecular (DM) todos los átomos bajo estudio son considerados clásicamente. Las interacciones entre átomos están divididas en interacciones enlazantes y no enlazantes, las primeras se producen entre átomos unidos químicamente mientras que las segundas tienen lugar entre pares de átomos dentro de un determinado radio de corte. Para determinar las interacciones no enlazantes (electrostáticas y van der Waals) a cada átomo se le asignan cargas parciales y parámetros de repulsión y atracción. Las interacciones enlazantes consisten en términos que incluyen enlaces, ángulos y diedros. Los enlaces y los ángulos son usualmente descriptos como osciladores armónicos y los ángulos diedros como un coseno ajustable de expansión.

Una función de potencial típica tiene la siguiente forma:

$$V = \sum_{i<j} \frac{q_i q_j}{4\pi \in_0 r_{ij}} + \sum_{i<j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} + \sum_{enlaces} \frac{1}{2} k_{ij}^{b} \left(r_{ij} - b_{ij}^{0}\right)^2$$
$$+ \sum_{ángulos} \frac{1}{2} k_{ij}^{\theta} \left(\theta_{ij} - \theta_{ij}^{0}\right)^2 \sum_{diedros} k^{\emptyset} \left(1 + \cos\left(n(\emptyset - \emptyset^0)\right)\right)$$

Aquí r_{ij} es la distancia entre los átomos (o pseudoátomos cuando el grupo CH_n es tratado como un átomo) i y j, q_i es la carga parcial sobre el átomo i, A_{ij} y B_{ij} son los parámetros de Lennard-Jones, k^b, k^θ y k^ϕ son las constantes de fuerza para enlaces, ángulos y diedros, n es la multiplicidad del diedro y b^0, b^θ y b^ϕ son valores de equilibrio para la longitud de enlace, ángulos y diedros. La forma precisa de la ecuación de función potencial es una elección para la que hay numerosas opciones. Sin embargo, la descripta anteriormente es razonablemente general y muestra las consideraciones más importantes que se han hecho: solo interacciones entre pares de átomos son tenidas en cuenta (interacciones no enlazantes involucrando tres o más átomos se desprecian), los átomos son representados como cargas puntuales (la polarizabilidad electrónica es despreciada) y formas cuadráticas simples son usadas para la eficiencia computacional. Usando esta función de potencial, es posible resolver la ecuación de movimiento para todos los átomos de un sistema a través del cálculo de las fuerzas actuantes e integrando en el tiempo. El principal resultado de tales cálculos es una trayectoria de todos los átomos en el tiempo, obteniéndose sus coordenadas y velocidades para cada paso de integración.

Los métodos de simulación por Dinámica Molecular (DM) se utilizan ampliamente para obtener información sobre la evolución temporal de la conformación biológica de las proteínas y otras macromoléculas y también dan información sobre la cinética y termodinámica de estos sistemas.

Simulaciones de Dinámica Molecular en Esfingosina Quinasa

Las simulaciones de DM se realizaron utilizando el paquete de software AMBER14[14], con el campo de fuerza ff99SB[15].

La geometría completa de la proteína se colocó en una caja con forma octaédrica de agua explícita utilizando el modelo TIP3P[16] empleando condiciones periódicas de contorno.

Las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon utilizando el método PME[17] (Particle Mesh Ewald) utilizando un espaciado de cuadrícula de 1,2 Å, un orden de interpolación spline de 4 y un corte de suma directa de espacio real de 10 Å. El algoritmo SHAKE[18] para restringir las longitudes de enlace se aplicó permitiendo un paso de tiempo de integración de 2 fs.

Las simulaciones de DM se llevaron a cabo en condiciones NPT a 310 K de temperatura, utilizando el termostato de Langevin[19]. Se realizaron tres simulaciones DM de 50 ns para cada sistema bajo diferentes funciones de distribución de velocidad de inicio; por lo tanto, en total se simularon 150 ns para cada complejo. Las condiciones NPT se emplearon usando el termostato de Berendsen a una presión objetivo de 1 atm y tiempo de relajación 0,1 ps. El análisis posterior a las DM se llevó a cabo con el programa *ptraj*[20], perteneciente al paquete de software AmberTools14[14].

Parametrización de ligandos

Para llevar a cabo las simulaciones de DM fue necesario generar topologías para los ligandos que formaron parte del sistema en estudio. La parametrización de los ligandos se realizó con el programa *antechamber*[21] capaz de generar topologías de un amplio espectro de moléculas orgánicas en forma prácticamente automática.

Descomposición por residuos de las energías de unión ligando-receptor

Para identificar los residuos que contribuyen en mayor medida a la interacción ligando-receptor se utilizó el método MM/GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) incluido en el programa *mm_pbsa* del paquete de software AMBER14[14].

Brevemente, la energía libre de unión ($\Delta G_{unión}$) resultante de la formación de un complejo entre un ligando (L) y un receptor (R) se calcula como:

$$\Delta G_{unión} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (1)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{interna} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW} \quad (2)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \quad (3)$$

donde ΔE_{MM}, ΔG_{sol} y $-T\Delta S$ son los cambios en la energía de la fase gaseosa, la energía libre de solvatación y la entropía conformacional al unirse, respectivamente. ΔE_{MM} incluye las energías $\Delta E_{interna}$ (energías de enlace, ángulo y diedros), ΔE_{ele} (electrostática) y ΔE_{vdW} (van der Waals). ΔG_{sol} es la suma de la energía de solvatación electrostática (contribución polar), ΔG_{PB}, y el componente de la solvatación no electrostática (contribución no polar), ΔG_{SA}. La contribución polar se calcula utilizando el modelo PB, mientras que la energía no polar se estima mediante el área superficial accesible al disolvente. El cambio de entropía conformacional $-T\Delta S$ generalmente se calcula mediante análisis en modo normal, pero en este estudio las contribuciones de entropía no se calcularon debido al costo computacional involucrado en tales cálculos.

2.1.3. Análisis QTAIM

En el análisis QTAIM (Quantum Theory of Atoms In Molecules), las interacciones que se estudian son del tipo no covalente y se determinan por medio de un análisis topológico de las densidades electrónicas entre distintos átomos no enlazados. Es posible determinar los diferentes tipos de interacciones, tales como distintos tipos de puentes de hidrógeno o interacciones del tipo π-stacking, al analizar los puntos críticos de unión y sus respectivos trayectos de unión[22].

Se calcularon las funciones de onda de diferentes compuestos unidos a los residuos del sitio de unión, considerando solo aquellos átomos pesados y que se encontraban a menos de 5 Å del ligando. La capa cuántica fue optimizada en el nivel teórico M062X/6-31G(d), y luego sometidos a un análisis QTAIM[23] utilizando el software Multiwfn[24].

Este tipo de cálculos se han utilizado en trabajos recientes porque asegura un compromiso razonable entre la calidad de la función de onda requerida para obtener valores confiables derivados de $\Sigma\rho(r)$ y la potencia de la computadora disponible, debido a la extensión de los sistemas en estudio[25–28].

2.1.4. Estudio de propensión dinámica

El estudio de propensión dinámica de puente de hidrógeno analiza la fracción de tiempo en la que se mantienen formados los puentes de hidrógenos de la cadena principal o BHB (Backbone Hydrogen Bonds) que pertenecen al sitio de unión de SphK1. Para esto se calcularon un total de 27.000 configuraciones de DM (tres réplicas de 45 ns), en todos los complejos estudiados. En cada tiempo de evaluación, si un par de residuos *i* y *j* de un cierto BHB satisface un criterio de enlace de hidrógeno (distancia de corte para N-O de $r < 3{,}5$ Å, y un ángulo de corte de N-H-O de $\theta > 140°$), la interacción correspondiente se vuelve 1, mientras que de lo contrario es 0. Luego, se promedian los resultados para todas las configuraciones evaluadas y, de esta manera se obtienen las fracciones de tiempo en que cada BHB permanece formado en cada caso.

Finalmente, para cada BHB calculamos valores “D” cómo la diferencia entre la propensión durante la dinámica y su correspondiente valor inicial (formado o no formado según el mismo criterio de distancia y ángulo) en la estructura PDB (en valor absoluto).

2.1.5. Modelo por homología de Esfingosina Quinasa 2

Para los estudios en la proteína Esfingosina Quinasa 2 (SphK2) se necesitó realizar un modelo por homología, ya que su estructura no se

encuentra aún cristalizada. Para esto se utilizó el programa MODELLER[29], el cual es un software especializado en la creación de geometrías por homología y/o para comparar distribuciones en tres dimensiones (3D) de diferentes proteínas.

La secuencia SphK2 humana (código: Q9NRA0) que se utilizó para el modelo se obtuvo de la base de datos UNIPROT (www.uniprot.org/). Estos datos fueron procesados realizando una búsqueda en BLAST. BLAST es un programa que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. Este programa compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos de secuencias y calcula la importancia estadística. Se identificó una quinasa, la Esfingosina Quinasa 1 (SphK1) de *Homo sapiens* (PDB ID: 4V24), como la combinación más cercana de la proteína con 52,12% de identidad y 44% de homología en el regiones alineadas. Las regiones desalineadas en la proteína se eliminaron del modelo. Se eligió para un mayor refinamiento el modelo de la proteína con la puntuación más baja de DOPE (Energía de Proteína Optimizada Discreta).

Se refinó la geometría mediante la realización de simulaciones de dinámica molecular (DM). La proteína modelada se colocó en cajas periódicas octaédricas de agua explícita usando el modelo TIP3P[16]. Se agregaron iones de sodio para neutralizar la carga del sistema. El sistema fue sometido a minimización de energía.

En el siguiente paso, el sistema se calentó en condiciones NVT de 0 a 300 K en 500 ps y se equilibró en un conjunto isobárico isotérmico (NPT) durante otros 2ns. Se utilizó un termostato Langevin para el ajuste de temperatura con una frecuencia de colisión de 1,0 ps^{-1}. El método de malla de partículas Ewald (PME) se empleó para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance en una condición periódica de contorno. El método SHAKE se usó para restringir los átomos de hidrógeno. El paso de tiempo para todas las DM fue de 2 fs. Finalmente, se realizaron tres simulaciones de DM de 50 ns bajo diferentes funciones de distribución de velocidad inicial; por lo tanto, en total se simularon 150 ns. Todas las simulaciones DM se realizaron con el paquete de software Amber14[14].

A partir de estas 3 DM, se tomaron los últimos 45 ns de cada una y se sometió a un proceso de clusterización, donde un total de 24.000 configuraciones fueron evaluadas. Se obtuvieron diez estructuras representativas a partir de una separación utilizando RMSD, que se ordenaron de forma decreciente de acuerdo a su población. A partir de la geometría de la estructura representativa más poblada, se realizaron los estudios de docking y DM para cada uno de los ligandos analizados. Para realizar el proceso de clusterización se utilizó el programa *cpptraj*[20], que forma parte del paquete AmberTools[14].

2.2. Métodos Experimentales

2.2.1. Síntesis

La síntesis de los distintos compuestos estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral fue realizada por el grupo de investigación dirigido por: Dr. Josef Jampilek en la Universidad de Veterinaria y Ciencias Farmacéuticas de Brno, Brno, República Checa; el Dr. Justo Cobo en la Universidad de Jaén, Jaén, España; y el Dr. Alirio Palma en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Los compuestos necesarios para la síntesis se adquirieron comercialmente y se usaron tal como se recibieron. Los puntos de fusión se midieron mediante un aparato electrotérmico Barstead 9100 o un aparato de placa caliente Kofler HMK (Franz Kustner Nacht GK, Dresden, Alemania). Los residuos se purificaron por cromatografía en una columna de gel de sílice 60 (40-63 μm, Merck 9385). Los espectros RMN ^{1}H y ^{13}C se registraron de forma estándar a 25ºC con cloroformo deuterado ($CDCl_3$), metanol deuterado (Metanol-d_4) o Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como solventes en los espectrómetros de RMN de FT Bruker AC-300, AC-500 o Avance III. La tipología de carbono (C, CH, CH_2 o CH_3) se dedujo de los experimentos RMN ^{13}C DEPT, que junto con los experimentos 2D, las correlaciones COSY, HSQC y HMBC, permitieron la asignación completa de todos los carbonos e hidrógenos. Los desplazamientos químicos son relativos a los picos de disolvente utilizados como referencia e informados en δ partes por millón (ppm), y valores de J en Hz. Los espectros de masas de alta resolución se midieron usando un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento Dionex UltiMate® 3000 (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, EE. UU.) Junto con espectrómetro de masa LTQ Orbitrap XL™ híbrido con trampa de iones y transformada de Fourier; por impacto electrónico operando a 70 eV.

2.2.2. Bioensayos

La medición de la actividad inhibitoria de los diferentes compuestos ensayados en este Trabajo de Tesis Doctoral fue realizada en el Laboratorio a cargo de la Dra. Sarah Spiegel en la Universidad Escuela de Medicina de Virginia (Virginia Commonwealth University School of Medicine), USA. Esta técnica de medición se caracteriza por no necesitar partición orgánica de productos, materiales radiactivos o equipos especializados. El ensayo sigue convenientemente los cambios de fluorescencia dependientes de esfingosina marcada con 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD), y puede realizarse fácilmente en formato de placa de 384 pocillos con volúmenes de reacción pequeños. Debido a la versatilidad y simplicidad del ensayo, la totalidad de los compuestos fueron analizados mediante esta técnica; la misma se encuentra ampliamente descripta en la siguiente publicación[30].

Como primer paso, los compuestos se disolvieron en DMSO y se les realizó un ensayo a una concentración de 650 μM; aquellos compuestos que mostraron algún tipo de inhibición se analizaron adicionalmente para obtener su IC_{50}.

Para cada prueba se utilizó 100 nM de SphK1 recombinante, 30 mM de Tris-HCl [pH 7,4], Triton X-100 al 0,05%, 150 mM de NaCl, glicerol al 10% y DMSO 1%. En la mezcla también se utilizó 12,5 μM de NBD-esfingosina y los inhibidores en las concentraciones indicadas. Todas las reacciones se prepararon como mezclas aisladas, se pusieron en placas de polipropileno de 384 pocillos y se dejaron equilibrar a 37 °C durante 10 minutos. Las reacciones se iniciaron con 20 mM de ATP, 200 mM de $MgCl_2$, 900 mM de Tris-HCl, a pH 7,4; y se siguieron en un lector de placas de fluorescencia TECAN Infinite M1000 a 37 °C. La longitud de onda de excitación fue de 550 nm y la longitud de onda de emisión fue de 584 nm con un ancho de banda de 5 nm. Todos los datos se analizaron usando el programa Prism (GraphPad, La Jolla, EE. UU.).

Por otra parte, en el laboratorio del Dr. Sergio Álvarez se llevó a cabo la expresión y purificación de SphK1 y se realizaron ensayos de actividad, sin embargo las cantidades de la proteína obtenida fueron muy bajas por lo cual los resultados no fueron reproducibles y difíciles de interpretar.

2.2.3. Ensayos de Toxicidad

La medición de los ensayos de toxicidad de los diferentes compuestos estudiados en este Trabajo de Tesis Doctoral fue realizada en el Laboratorio a cargo del Dr. Justo Cobo en la Universidad de Valencia, España y de la Dra. Sarah Spiegel en la Universidad Escuela de Medicina de Virginia (Virginia Commonwealth University School of Medicine), USA.

Cultivo Celular

Se aislaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) mediante tratamiento con colagenasa[31] y se mantuvieron en medio basal endotelial específico humano (EBM-2), complementado con medios de crecimiento endotelial (EGM-2) y 10% de suero bovino fetal (FBS). Las células se cultivaron hasta alcanzar confluencia para preservar las características endoteliales. Antes de cada experimento, las células se incubaron durante 16 horas en un medio que contenía 1% de FBS.

Ensayo de proliferación celular con MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima

mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir la supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron tanto con células HUVEC como con neutrófilos humanos recién aislados utilizando el ensayo colorimétrico del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)[32]. Los neutrófilos se obtuvieron a partir de capas leucocíticas de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque como se describe[33]. Se añadieron 100 μL de neutrófilos y la suspensión de HUVEC suplementados en medio RPMI (2 x 10^5 células/mL) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las células se incubaron en ausencia o presencia de compuestos a 37 °C durante 24 horas. Se añadieron 100 μl de MTT a cada pocillo y se incubaron a 37 ºC durante otras 3 horas. Los sobrenadantes se descartaron y se añadieron 200 μl de DMSO a cada pocillo para disolver el formazán. Se determinaron las densidades ópticas en longitudes de onda duales (560 y 630 nm) en un espectrofotómetro Infinite M200. Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media (SEM).

Interacciones leucocito-endoteliales en condiciones de flujo

El proceso de extravasación leucocitaria, un paso crucial de la respuesta inflamatoria, implica la migración de los leucocitos desde la corriente sanguínea hasta los tejidos diana donde ejercen su función efectora. La extravasación de los leucocitos está dirigida por la acción conjunta de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos, e implica cambios morfológicos drásticos tanto en leucocitos como en células endoteliales. De este modo, constituye un proceso activo para ambos tipos celulares que promueve la rápida y eficiente llegada de los leucocitos a los focos inflamatorios sin comprometer la integridad de la barrera endotelial.

Para estudiar este proceso, se llevó a cabo la medición de las interacciones leucocito-endoteliales en condiciones de flujo, en presencia de diferentes compuestos con actividad inhibitoria para SphK1 y/o SphK2 reportados en este Trabajo de Tesis Doctoral.

Las células HUVEC se cultivaron hasta alcanzar confluencia y se estimularon con TNF-α humano recombinante (20 ng/mL) durante 24 horas. Algunas células se preincubaron con compuestos a concentraciones desde 0,1 μM a 100 μM o con vehículo que contenía DMSO al 0,04 % durante 24 horas antes de la estimulación con TNF-α. Las células mononucleares y neutrófilos de humanos se obtuvieron a partir de capas leucocíticas de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-

Hypaque. La cámara de flujo Glycotech se ensambló y se colocó en una plataforma de microscopio invertido. Se aislaron neutrófilos o células mononucleares (1 x 10^6 células/mL) a través de las monocapas endoteliales (HUVEC) no estimuladas o estimuladas con 20 ng/mL de TNF-α durante 24 horas. Las interacciones leucocitarias se determinaron después de 5 min a 0,5 dyn/cm^2. Las células que interactúan en la superficie del endotelio se visualizaron y registraron utilizando un microscopio de contraste de fase (microscopio Axio Observer A1 Carl Zeiss).

2.3. Referencias

(1) Seeliger, D.; de Groot, B. L. Ligand Docking and Binding Site Analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (5), 417–422.

(2) Rollinger, J. M.; Stuppner, H.; Langer, T. Virtual Screening for the Discovery of Bioactive Natural Products. *Prog. Drug Res.* **2008**, *65*, 211,213-249.

(3) Rester, U. From Virtuality to Reality - Virtual Screening in Lead Discovery and Lead Optimization: A Medicinal Chemistry Perspective. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2008**, *11* (4), 559–568.

(4) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

(5) O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox. *J. Cheminform.* **2011**, *3* (1), 33.

(6) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.

(7) John W. Eaton, David Bateman, Søren Hauberg, R. W. GNU Octave version 3.8.1 manual: a high-level interactive language for numerical computations.

(8) Sing, T.; Sander, O.; Beerenwinkel, N.; Lengauer, T. ROCR: Visualizing Classifier Performance in R. *Bioinformatics* **2005**, *21* (20), 3940–3941.

(9) R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing http://www.r-project.org/.

(10) Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B.; et al. ChEMBL: A Large-Scale Bioactivity Database for Drug Discovery. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (Database issue), D1100-7.

(11) Gasteiger, J.; Marsili, M. A New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (34), 3181–3184.

(12) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662.

(13) A., E. T. J.; D., K. I. Critical Evaluation of Search Algorithms for Automated Molecular Docking and Database Screening. *J. Comput. Chem.* **1998**, *18* (9), 1175–1189.

(14) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; et al. *{Amber 14} OR - University of California, San Francisco*; **2014**.

(15) L. Jorgensen, W.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; W. Impey, R.; L. Klein, M. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**; Vol. 79.

(16) Mark, P.; Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105* (43), 9954–9960.

(17) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12).

(18) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.

(19) Wu, X.; Brooks, B. R. Self-Guided Langevin Dynamics Simulation Method. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *381* (3), 512–518.

(20) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9* (7), 3084–3095.

(21) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J Molec Graph Model* **2006**, *25*.

(22) Koch, U.; Popelier, P. L. A. Characterization of C-H-O Hydrogen Bonds on the Basis of the Charge Density. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99* (24), 9747–9754.

(23) Bader, R. F. W. Atoms in Molecules. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18* (1), 9–15.

(24) Lu, T.; Chen, F. Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (5), 580–592.

(25) Gutierrez, L. J.; Angelina, E.; Gyebrovszki, A.; Fulop, L.; Peruchena, N.; Baldoni, H. A.; Penke, B.; Enriz, R. D. New Small-Size Peptides Modulators of the Exosite of BACE1 Obtained from a Structure-Based Design. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *35* (2), 413–426.

(26) Gutierrez, L. J.; Barrera Guisasola, E. E.; Peruchena, N.; Enriz, R. D. A QM/MM Study of the Molecular Recognition Site of Bapineuzumab toward the Amyloid-β Peptide Isoforms. *Mol. Simul.* **2016**, *42* (3).

(27) Vega-Hissi, E.; Tosso, R.; Daniel Enriz, R.; Joel Gutierrez, L. Molecular Insight into the Interaction Mechanisms of Amino-2H-Imidazole Derivatives with BACE1 Protease: A QM/MM and QTAIM Study. *Int. J. Quantum Chem.* **2014**; Vol. 115.

(28) Barrera Guisasola, E. E.; Gutiérrez, L. J.; Salcedo, R. E.; Garibotto, F. M.; Andujar, S. A.; Enriz, R. D.; Rodríguez, A. M. Conformational Transition of Aβ42 Inhibited by a Mimetic Peptide. A Molecular Modeling Study Using QM/MM Calculations and QTAIM Analysis. *Comput. Theor. Chem.* **2016**, *1080*.

(29) Sali, A.; Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234* (3), 779–815.

(30) Lima, S.; Milstien, S.; Spiegel, S. A Real-Time High-Throughput Fluorescence Assay for Sphingosine Kinases. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (7), 1525–1530.

(31) Rius, C.; Company, C.; Piqueras, L.; Cerda-Nicolas, J. M.; Gonzalez, C.; Servera, E.; Ludwig, A.; Morcillo, E. J.; Sanz, M.-J. Critical Role of Fractalkine (CX3CL1) in Cigarette Smoke-Induced Mononuclear Cell Adhesion to the Arterial Endothelium. *Thorax* **2013**, *68* (2), 177–186.

(32) Iacobini, M.; Menichelli, A.; Palumbo, G.; Multari, G.; Werner, B.; Del Principe, D. Involvement of Oxygen Radicals in Cytarabine-Induced Apoptosis in Human Polymorphonuclear Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61* (8), 1033–1040.

(33) Mateo, T.; Naim Abu Nabah, Y.; Losada, M.; Estelles, R.; Company, C.; Bedrina, B.; Cerda-Nicolas, J. M.; Poole, S.; Jose, P. J.; Cortijo, J.; et al. A Critical Role for TNFalpha in the Selective Attachment of Mononuclear Leukocytes to Angiotensin-II-Stimulated Arterioles. *Blood* **2007**, *110* (6), 1895–1902.

Capítulo 3

Estudios estructurales de Esfingosina Quinasa

3.1. Introducción

Las SphK1 y SphK2 constituyen una clase distinta de la familia de quinasas lipídicas, que es evolutivamente muy conservada[1] y no comparten homología de secuencia con otras quinasas lipídicas, tales como fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). Se han identificado cinco dominios conservados (C1-C5) dentro de SphKs, con C1-C3 y C5 que comparten homología con diacilglicerol quinasa (DGK), fosfofructoquinasa (PFK)[2] y ceramida quinasa, y C4 es único para SphKs[3–5].

Dado que no se obtuvieron cristales de la proteína SphK1 humana completa, la proteína utilizada contiene de 9-364 residuos de una longitud total de 384 aminoácidos[6,7]. La proteína se ha cristalizado tanto en la forma apo y en presencia de diversas combinaciones de ADP, sustrato/producto, así como inhibidores[8–10].

Las estructuras reportadas para SphK1 revelan una arquitectura de dos dominios con el sitio catalítico situado en la hendidura entre estos dominios y un bolsillo de unión lipídico hidrofóbico que está enterrado en el dominio C-terminal[11].

Se describirán en este capítulo las características estructurales más importantes a tener en cuenta para así tener un modelo que permita la posterior búsqueda de inhibidores específicos de SphK1 partiendo de los datos cristalográficos disponibles hasta el momento. A partir de simulaciones de dinámica molecular, se analizaron las diferentes interacciones, tanto estabilizantes como desestabilizantes, para los diferentes ligandos, entre ellos, **esfingosina** (ligando natural de SphK)[12] y 3 inhibidores, **SKI-II**[12], **1v2**[9] y **PF-543**[10]. Por último, se evaluó el nivel de predicción de distintos programas de docking para situar los ligandos correctamente dentro del bolsillo de unión.

3.2. Estructura general

La estructura general de SphK1 (residuos 9-364) adopta una arquitectura de dos dominios que comprende nueve α hélices, 17 hebras β, y una hélice 3_{10} (Figura 1). Vale aclarar que los aminoácidos en una hélice 3_{10} están dispuestos en una estructura helicoidal de sentido horario y ésta es una estructura poco común.

El dominio N-terminal (NTD) (residuos 9-150 y 357-364, que contiene los dominios C1-C3) adopta un plegamiento α/β y comprende seis α hélices (α1-α6), seis hojas β (β1-β5 y β17), asemejándose al modo de unión de dinucleótido de un pliegue Rossmann de tres capas α/β/α (tipo sándwich)[13].

El núcleo del NTD es una hoja paralela torcida de cuatro hebras β (el orden de las hebras es β2, β1, β3, β4), que se extiende por una subestructura de cadenas antiparalelas β17 y β5, con una cadena β17 ubicada paralela a la hoja plegada β4. La hoja β central está rodeada por tres hélices en cada lado: α2, α3, y α4 en un lado y α1, α5 y α6 en el otro. Debe considerarse que en la porción C-terminal de la cadena, β17 forma la sexta hoja β del NTD, una característica de intercambio de elementos de la estructura secundaria entre los dos dominios.

El dominio C-terminal (CTD) (residuos 151-356, que contiene los dominios C4 y C5) comprende once hebras β y cuatro α hélices. Las once hojas β se disponen en dos capas β antiparalelas, por un lado: β7, β6, β16, β13 y β9 y en el "frente" de la hoja se encuentran β15, β14, β8, β10, β11, β12 y tres hélices (α7-α9, y una hélice 3_{10} siguiente a la hélice α9) sobre la lámina delantera del sándwich, mientras que un bucle largo enrollado (circular β9-β10, residuos 214-256) cubre la hoja posterior.

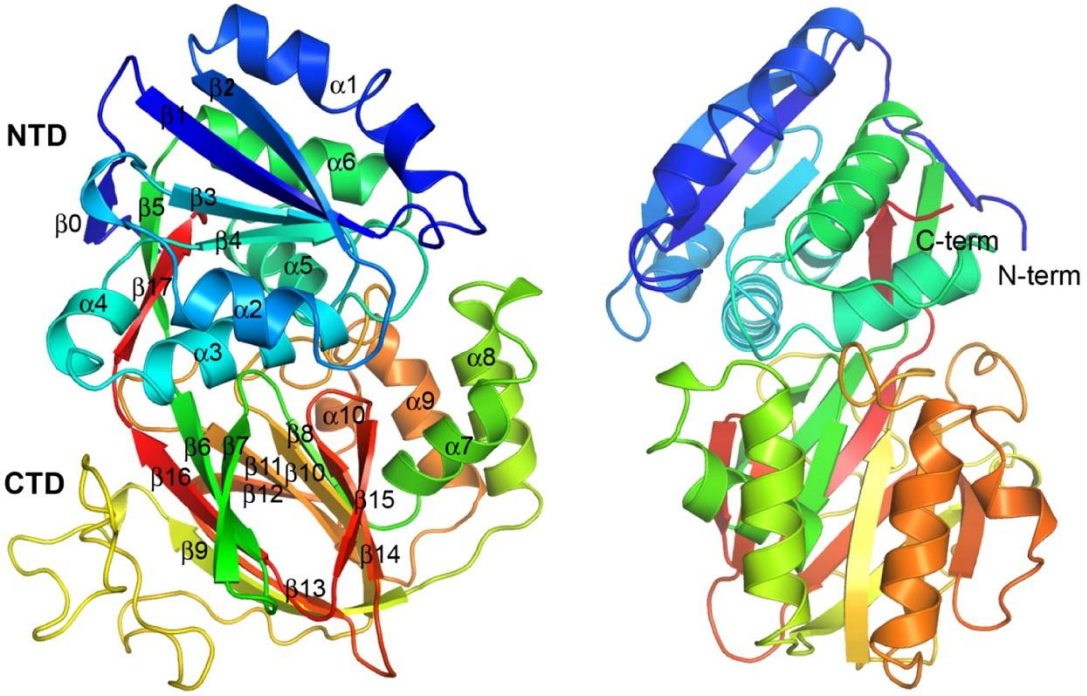


Fig. 1. Representación tipo cartoon de la estructura de SphK1 en dos orientaciones. El diagrama de cinta está coloreado en un espectro que comienza con azul para el extremo N-terminal y finaliza en rojo para la porción C-terminal.

El análisis de la secuencias de las proteínas y clasificación de su estructura sugiere que SphKs pertenecen a la superfamilia de fosfofructoquinasa (PFK)[2,14], compartiendo la misma estructura con NAD, DGKs[15] y ceramida quinasas. De hecho, la estructura de SphK1 no guarda similitud con proteínas quinasas u otras quinasas lipídicas, tales como fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). El pliegue general de SphK1 muestra una arquitectura de dos dominios similares a los de NAD quinasas[16–19] y

DGKs[3,20,21], a pesar de que SphK1 comparte con ellos una muy baja identidad de secuencia global (10% - 20% sobre 250 residuos). Sin embargo, SphK1 muestra diferencias estructurales sustanciales con cualquiera de las NAD quinasas o DGKs, especialmente en el CTD. Posiblemente, la diferencia más notable es que SphK1 posee una disposición helicoidal distinta ya que está plegada sobre la lámina delantera de la hoja β sándwich y un bucle en espiral en la hoja de vuelta en el CTD.

3.2.1. Unión lipídica a CTD

La unión de **esfingosina** (**Sph**) a SphK1 está mediada tanto por un anclaje del grupo de cabeza hidrófilo a la superficie de la proteína como por el alojamiento de la cadena alquílica hidrofóbica en el interior de la proteína. La larga cadena de acilo está enterrada en un túnel hidrofóbico en forma de J, revestido por las cadenas laterales de los residuos en su mayoría no polares (hebras β10-β12 de la hoja frontal del sándwich β, el bucle β10-β11, las hélices α7-α9, y la hélice 3_{10}) (Figura 2A). Estos residuos incluyen F173, I174, V177 de la hélice α7; F192 y T196 de la hélice α8; L299, L302, F303 y M306 de la hélice α9; H311 de la hélice 3_{10}; L319 de la hoja β12; F288 y V290 de la hoja β11; L259 y L261 de la hoja β10, A170 de la hoja β8, y L268, M272 y A274 del bucle β10 – β11. Vale aclarar que en este trabajo de tesis doctoral, nos referiremos a los aminoácidos utilizando el código de una sola letra.

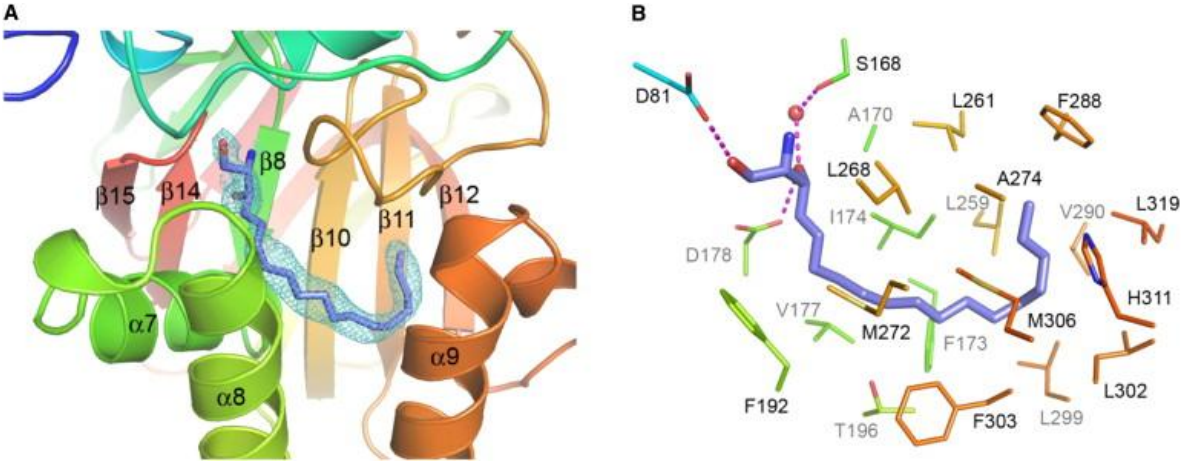


Fig. 2. Unión del sustrato lipídico a SphK1. **(A)** Modo de unión de **Sph** en la porción C terminal de SphK1. El ligando natural **Sph** se muestra en color violeta claro, con los átomos de oxígeno y nitrógeno representados de color rojo y azul, respectivamente. **(B)** Interacciones detalladas entre **Sph** y los residuos de SphK1. Las interacciones puente de hidrógeno están simbolizadas con líneas de puntos color magenta. La esfera color rojo simboliza una molécula de agua.

El resto 2-amino-1,3-diol del grupo de la cabeza de **Sph** está situado en la hendidura entre los dos dominios. Las interacciones que predominan son un puente de hidrógeno con D81 situado en el bucle β3-α3 (residuos

S79-G82) a través de 1-hidroxilo y con D178 de la hélice α7 con 3-hidroxilo, que a su vez también forma un puente de hidrógeno mediado por agua con S168 de la hebra β8 (Figura 2B).

La cavidad de unión de lípidos que forma la **Sph** dentro de SphK1 está casi completamente enterrada, dejando sólo una pequeña entrada de 8,5 Å de diámetro alrededor del grupo de la cabeza polar en la hendidura entre el NTD y CTD (Figura 3A). El análisis de la proteína en su forma apo, que carece de densidad extra para una molécula de lípido, revela una cavidad de forma similar con una entrada parecida alrededor del grupo polar, en comparación con la enzima holo. Además, hay una abertura lateral con una dimensión de 10 Å a lo largo de la molécula del lípido (Figura 3B). El volumen accesible al disolvente del bolsillo de unión de lípidos se mide en alrededor de 400 $Å^3$ y 700 $Å^3$ para la forma holo y apo de la enzima, respectivamente, lo que indica que preexiste una cavidad de unión de lípidos en forma libre y no libre como consecuencia de la unión a lípidos.

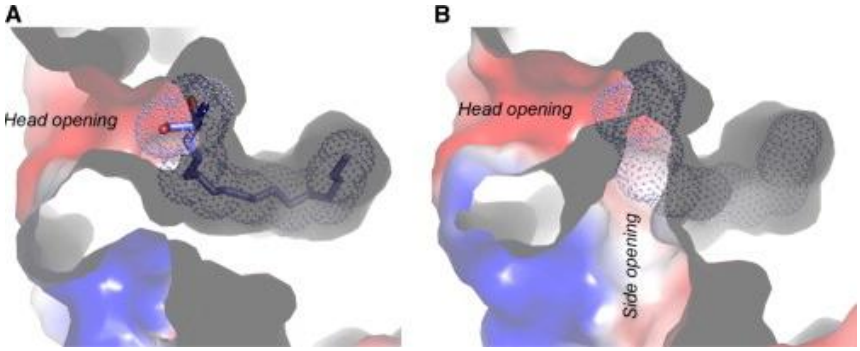


Fig. 3. (A) Bolsillo de unión lipídica unido a **Sph**. La proteína se muestra en una representación de superficie molecular electrostática. El lípido está simbolizado en color violeta con una representación de superficie de van der Waals en puntos. **(B)** Bolsillo de unión lipídica libre, con la superposición de una representación de superficie de van der Waals en puntos de **Sph**.

La superposición de las estructuras SphK1 apo y unida a **Sph** revela esencialmente que no hay diferencias en la mayoría de la proteína, pero hay un movimiento evidente en la región de las hélices α7-α8 en el dominio C4 (Figura 4). Las dos proteínas se pueden superponer con un RMSD (Root-mean-square deviation) de 1,14 Å para 336 átomos (casi todos los residuos excepto unos pocos residuos en el extremo N-terminal), y un RMSD de 0,78 Å para 309 átomos, mediante la exclusión de los residuos de la hélice α7 a α8, que mostraron la mayor desviación. Ambas hélices, α7 y α8 hacia el exterior y el bucle α7-α8 (residuos E182-E189) se reestructuran por completo, dando lugar a la apertura lateral en la estructura apo (Figura 3B). Por lo tanto, la bibliografía sugiere que este segmento de α7-α8 en SphKs podría actuar como una puerta de lípidos que controla la entrada y salida del sustrato lipídico y el producto[8].

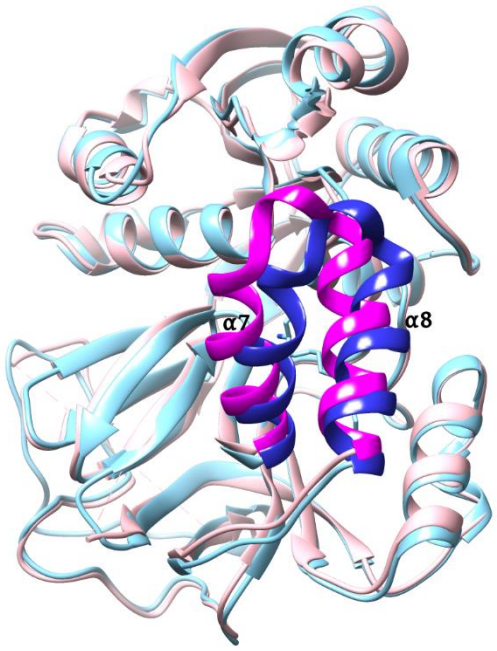


Fig. 4. Superposición de SphK1 en su forma apo (rosa claro) y holo (celeste). Se destaca la "puerta lipídica" formada entre las hélices α7-α8 con color magenta y azul, respetivamente.

3.2.2. Unión del nucleótido en la hendidura entre NTD y CTD

El sitio de unión de los nucleótidos se encuentra en una hendidura extendida entre NTD y CTD (Figura 5A). El adenosín difosfato (ADP) presenta una gran cantidad de interacciones con la proteína, como se muestra en la Figura 5B. El anillo de adenina se intercala entre el bucle β1-α1 (residuos 22-29, del dominio C1) y el bucle β2-α2 (residuos 54-58), estableciendo interacciones π con los carbonos α (Cα) de E55 y R56, y con la cadena lateral de N22. El anillo también forma dos interacciones puente de hidrógeno con T54: el grupo amino N6 se une al carbonilo de T54 y el átomo N7 al hidroxilo de la cadena lateral de T54. Los hidroxilos de la ribosa unidos a C2 y C3 establecen puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de E86 (dominio C2) y E343 (dominio C5), respectivamente. El α-fosfato, que se acomoda en el extremo N-terminal de la hélice α3, está en estrecho contacto con el bucle α3-β3 (residuos 79 a 82, del dominio C2). Un átomo de oxígeno de α-fosfato establece un puente de hidrógeno con el hidroxilo de S79 y la amida de G80. El otro átomo de oxígeno de α-fosfato se coordina con iones de Mg^{2+} que también interactúa con el carbonilo de la cadena principal de D341 y de la cadena lateral de E343. Los átomos unidos a β-fosfato establecen varios enlaces puente de hidrógeno con la proteína, que une tanto NTD como CTD, incluyendo las cadenas laterales de R185 y R191 y las amidas de la cadena principal de S112 y G113, así como el hidroxilo de la cadena lateral de S112. En resumen, esta elucidación estructural de la unión de ADP demuestra la

presencia de una amplia zona de unión de nucleótidos en SphK1, con contribuciones de los cinco dominios conservados.

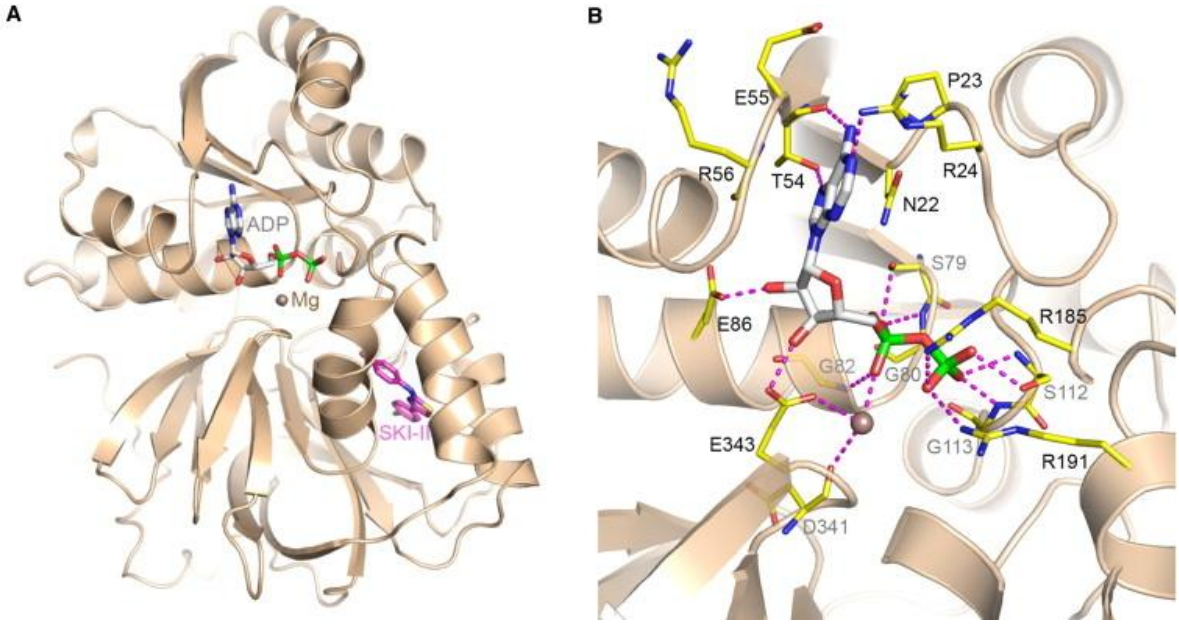


Fig. 5. (A) Diagrama representativo de SphK1 en presencia de ADP, Mg^{+2} y **SKI-II**. ADP se ubica en una hendidura extendida entre NTD y el CTD. **(B)** Interacciones detalladas de ADP en SphK1. Se indican los enlaces puente de hidrógeno en línea de puntos color magenta. En amarillo se resaltan los residuos más importantes interaccionando con ADP en su sitio de unión. El átomo de Mg^{2+} se representa con una esfera color marrón. Para los átomos de oxígeno, nitrógeno y fosforo se utilizó el color rojo, azul y verde, respectivamente.

3.2.3. Unión del inhibidor SKI-II en el sitio activo

SKI-II ocupa el extremo distal del bolsillo lipídico (Figura 6A), con el anillo clorofenil situado en el extremo de la bolsa y el anillo fenólico orientado hacia la abertura de la hendidura entre el NTD y CTD. El hidroxilo del fenol se encuentra formando un enlace puente de hidrógeno con D178 de la hélice α7, que conduce a una conformación cerrada de la puerta lipídica. El grupo amino está también a poca distancia y realizando un enlace puente de hidrógeno con el hidroxilo de T196 de la hélice α8 (Figura 6B). En el otro extremo, el átomo de Cl hace estrecho contacto con el anillo aromático de F288. El resto de la molécula forma numerosas interacciones de van der Waals con un conjunto similar de residuos no polares que reconocen la cola hidrofóbica del sustrato lipídico. La estructura indica claramente que **SKI-II** es un inhibidor competitivo del sustrato lipídico, en lugar de ser un inhibidor del sitio de ATP como la mayoría de los inhibidores de proteínas tipo quinasas.

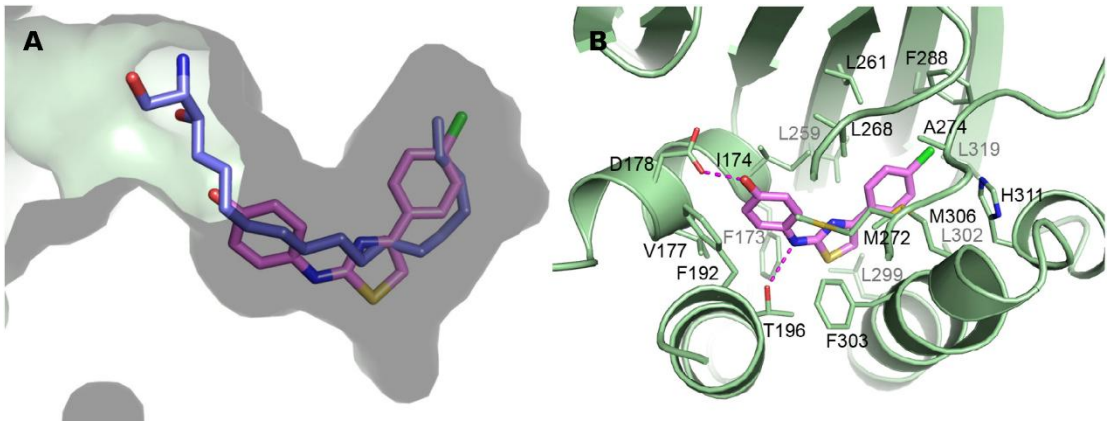


Fig. 6. (A) Superposición de **Sph** (violeta claro) y **SKI-II** (magenta) en el bolsillo de unión de SphK1. La proteína se muestra en una representación de superficie color celeste. Los colores rojo, azul, amarillo y verde son utilizados para simbolizar átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre y cloro, respectivamente. **(B)** Interacciones detalladas ligando-proteína entre **SKI-II** y SphK1. Se resaltan los aminoácidos más importantes en la formación del complejo ligando-proteína. Los enlaces puente de hidrógeno se representan con líneas punteadas color magenta.

3.2.4. Unión del inhibidor 1v2 en el sitio activo

El compuesto **1v2** se une a SphK1 en el mismo bolsillo que **Sph** y ocupa el espacio a lo largo de toda su longitud (Figura 7). Como se puede observar en la Figura 7A, el fragmento tri-arilo de **1v2** se orienta como **SKI-II**. En esta posición, los dos átomos de cloro se encuentran en un bolsillo hidrofóbico compuesto por residuos de las hélices α9 y 3_{10}, las cadenas β10-β12 y el bucle β10-β11. El cloro en la posición 'meta' hace interacciones de van der Waals con M306, L261 y L268. Al mismo tiempo, el cloro en la posición '*para*' hace contactos de van der Waals con F288, H311 y L319.

Uno de los datos más importantes recopilados a partir de la estructura cristalina de **1v2** en SphK1 es que los grupos hidroxilo parecen imitar las ubicaciones e interacciones observadas en la estructura cristalina de Sph con SphK1. La superposición de las estructuras co-cristalinas de **Sph** y el **1v2** con SphK1 muestran que el átomo de oxígeno del hidroxilo en la posición 4-piperidina se encuentra en una posición similar al hidroxilo de C1 de **Sph**, donde el ángulo (120º) y la distancia (2,8 Å) al grupo carboxilo de D81 sugieren la formación de un enlace puente de hidrógeno. Del mismo modo, el átomo de oxígeno del grupo hidroximetilo de piperidina se encuentra en un ángulo de un poco más de 120º y la distancia de 2,5 Å del carboxilo de D178 propicios para la presencia de un enlace puente de hidrógeno. El oxígeno del grupo hidroximetilo de piperidina también parece participar en una red de enlaces puente de hidrógeno mediada por agua con A339, G342, D341 y S168 como la observada con **Sph**. El D178 parece interactuar con **1v2** de una manera bi-dentada en la que un átomo de oxígeno participa en la red de enlaces puente de hidrógeno con el grupo

hidroximetilo, mientras que el otro participa en un puente salino con el nitrógeno de piperidina. Es interesante notar que D178 se rota 90º en complejo con **1v2** en comparación con su complejo con **SKI-II**.

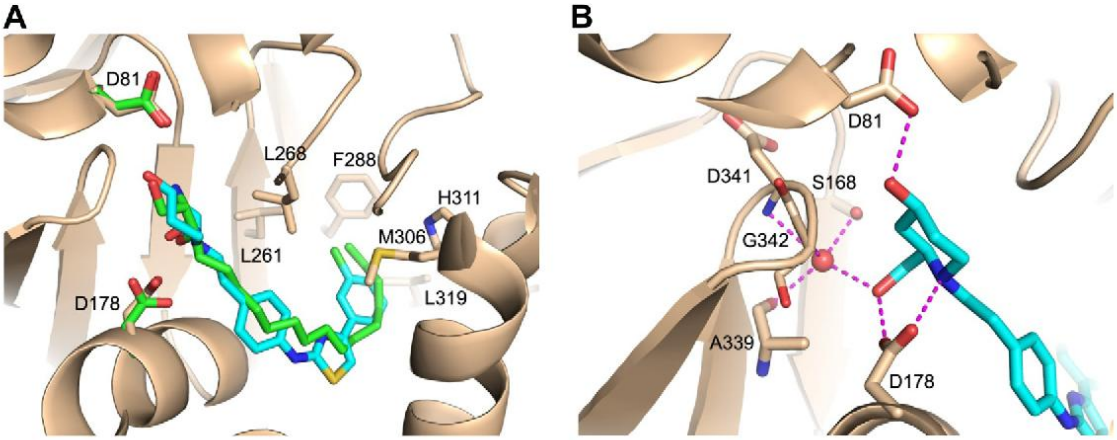


Fig. 7. (A) Superposición de las estructuras co-cristalinas de SphK1 con **1v2** (cian) y **Sph** (verde). **(B)** Estructura cristalina de **1v2** en SphK1 (código PDB: 4L02) que destaca el resto piperidina del ligando. La molécula de agua se representa con una esfera color rojo y los enlaces puente de hidrógeno con líneas de puntos color magenta. Los átomos de oxígeno y nitrógeno se representan en color rojo y azul, respectivamente.

3.2.5. Unión del inhibidor PF-543 en el sitio activo

Para el caso de **PF-543**, se utilizó la isoforma 2 de SphK1 (NP_892010.2, base de datos NCBI) para obtener los datos cristalográficos, donde los residuos 81-449 son equivalentes a 9-377 de la isoforma 1 (NP_068807.2) o 1-363 de la isoforma 3 (NP_001136074.1). Por este motivo, debe notarse que los aminoácidos cambian su numeración en este caso, siendo la isoforma 3 la escogida para este trabajo de tesis.

PF-543 adopta una conformación en forma de J, imitando la conformación de los lípidos observada en las estructuras anteriores (Figura 2 y 6) con el anillo fenilo terminal ocupando la parte hidrofóbica del bolsillo formado por los residuos F374 y Leucinas 347, 354, y 405 (Figura 8). El terminal (*R*)-2-(hidroximetil)-pirrolidina se une en la posición esperada para un grupo de cabeza polar, adyacente al sitio de unión para el γ-fosfato del ATP. Los enlaces puente de hidrógeno se forman a partir del nitrógeno de la pirrolidina y el 1-hidroxilo con la cadena lateral de D264 (Figura 8) (D264 es equivalente a D178 en la isoforma 3 de SphK1). El anillo aromático central sustituido con el metilo forma interacciones favorables con las cadenas laterales de F259 y F389, mientras que su sustituyente metilo interacciona con L385 y L286. Inesperadamente, la cadena lateral de T282, uno de los pocos residuos no hidrofóbicos en el sitio de unión de lípidos, no forma un enlace puente de hidrógeno con el oxígeno del éter de **PF-543**.

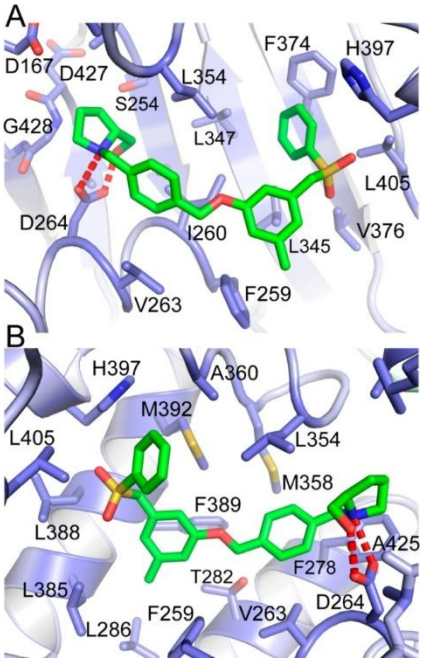


Fig. 8. Unión de **PF-543** (verde) a SphK1 vista desde dos direcciones opuestas. En ambas figuras, los residuos delante de **PF-543** han sido eliminados para mayor claridad. Los residuos están numerados para la isoforma 2 de SphK1 como fue cristalizada; se debe restar 86 para obtener los residuos equivalentes en la isoforma 3.

3.3. Estudios de dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es una técnica de simulación por computadora en la que se permite que átomos y moléculas interactúen por un período de tiempo, permitiendo una visualización del movimiento de las partículas. Si bien los experimentos de cristalografía de rayos X permiten tomar "fotografías estáticas" y la técnica de RMN da indicios del movimiento molecular, ningún experimento es capaz de acceder a todas las escalas de tiempo involucradas. Resulta tentador, aunque no es enteramente correcto, describir a la DM como un "microscopio virtual" con alta resolución espacial y temporal.

En general, los sistemas moleculares son complejos y consisten de un gran número de partículas, por lo cual sería imposible encontrar sus propiedades de forma analítica. Para evitar este problema, la DM utiliza métodos numéricos. La DM representa un punto intermedio entre los experimentos y la teoría. Puede ser entendida como un experimento en la computadora.

La dinámica molecular es un campo multidisciplinario. Sus leyes y teorías provienen de las matemáticas, física y química. Emplea algoritmos de las ciencias de la computación y teoría de la información. Permite entender a los materiales y las moléculas no como entidades rígidas, sino como cuerpos animados. También se le ha llamado "estadística mecánica

numérica" o "la visión de Laplace de la mecánica Newtoniana", en el sentido de predecir el futuro al animar las fuerzas de la naturaleza.

Para utilizar esta técnica de forma correcta, es importante entender las aproximaciones utilizadas y evitar caer en el error conceptual de que estamos simulando el comportamiento real y exacto de un sistema molecular. La integración de las ecuaciones de movimiento está mal condicionada, lo cual genera errores numéricos acumulativos, que pueden ser minimizados seleccionando apropiadamente los algoritmos, pero no son eliminados del todo. Por otro lado, las interacciones entre las partículas se modelan con un campo de fuerza aproximado, que puede o no ser adecuado dependiendo del problema que queremos resolver. De cualquier forma, la dinámica molecular permite explorar su comportamiento representativo en el espacio físico.

En la DM, hay que balancear el costo computacional y la fiabilidad en los resultados. En la DM clásica se utilizan las leyes de Newton, cuyo costo computacional es mucho menor que el de la mecánica cuántica. Es por ello que muchas propiedades que pueden resultar de interés, como la formación o ruptura de enlaces no puedan ser estudiados mediante este método ya que no contempla estados excitados o reactividad.

Luego de analizar la información disponible en bibliografía sobre SphK1, se llegó a la conclusión de que la misma solo se basaba en datos cristalográficos. Por este motivo, se realizaron simulaciones de dinámica molecular para estudiar cuáles eras las modificaciones más importantes en cada uno de los complejos una vez estabilizado el sistema. Cabe destacar que los datos cristalográficos, si bien son de muchísima utilidad, son obtenidos de sistemas a los cuales se los expuso a condiciones extremas y no siempre se condice con la realidad[22].

En este estudio se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 50 ns por triplicado para cada complejo estudiado. A partir de estos datos, se llevaron a cabo diferentes tipos de estudios para determinar rasgos característicos de SphK1: cálculos de energía de afinidad, descomposición por residuo, puente de hidrógeno, etc. En este capítulo se analizan cada uno de estos puntos.

Para estimar las energías relativas de unión de cada uno de los complejos formados en SphK1 se empleó el método MM-GBSA y MM-PBSA utilizando el programa *mm_pbsa*[23] de AMBER14[24]. Para realizar estos cálculos, se utilizaron los últimos 40 ns de las trayectorias generadas a partir de la DM, seleccionando *snapshots* cada 2 pasos de simulación y removiendo las moléculas de agua. Este tipo de cálculos permite descomponer las energías de interacción para cada residuo de la proteína en estudio considerando las energías de solvatación y mecánica molecular[25]. Cada par de interacciones ligando-residuo incluye cuatro términos energéticos distintos: una contribución de tipo van de Waals (ΔE_{vdW}), otra de

tipo electrostática (ΔE_{ele}), un término de solvatación polar (ΔG_{GB}) y uno de solvatación no polar (ΔG_{SA}). Cada uno de estos términos se resume en la siguiente fórmula.

$$\Delta G_{unión} = \Delta E_{vdW} + \Delta E_{ele} + \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA}$$

En la Figura 9 se representa una correlación entre los datos obtenidos mediantes estas dos técnicas (MM-GBSA y MM-PBSA) *versus* el logaritmo del valor de concentración inhibitoria media (IC_{50}). Como se puede observar, el valor de R^2 es similar para ambas técnicas (~0,77 en ambos casos), el valor obtenido es solo regular, ya que no se puede distinguir entre los compuestos **PF-543** (IC_{50} = 2 nM) y **1v2** (IC_{50} = 20 nM). Esto estaría indicando, de manera preliminar, que estas técnicas *per se* no son buenas herramientas para la búsqueda de nuevos inhibidores para SphK1 que nos permitan predecir correctamente sus actividades.

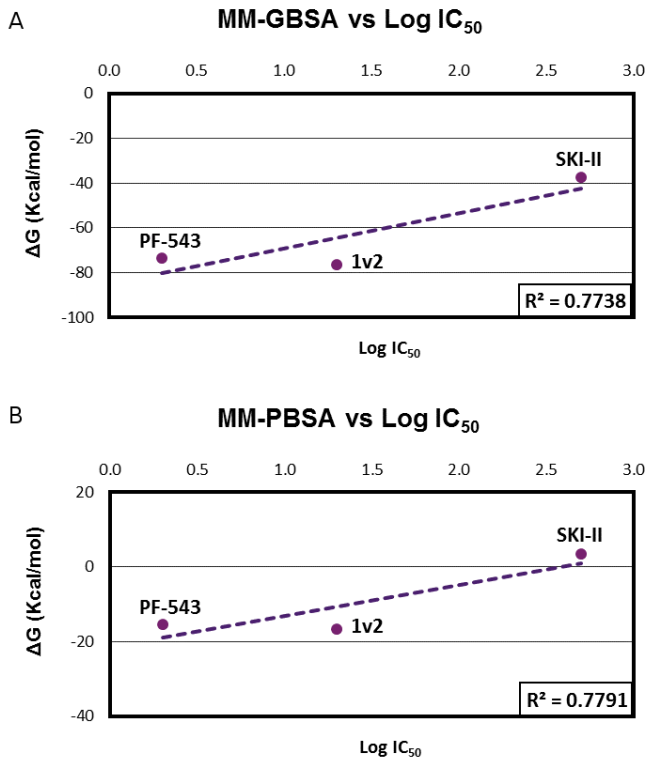


Fig. 9. Gráfico de correlacion entre los datos obtenidos mediante técnicas **(A)** MM-GBSA y **(B)** MM-PBSA *vs* el logaritmo de la concentración inhibitoria media para cada inhibidor cristalizado.

Otro dato más que interesante que se puede obtener mediante el estudio MM-GBSA es la descomposición por residuo. A partir de este análisis, es posible determinar cuáles son los aminoácidos que interactúan estabilizando o desestabilizando la unión con los ligandos. En la Figura 10 se puede ver la descomposición por residuos realizada para cada complejo.

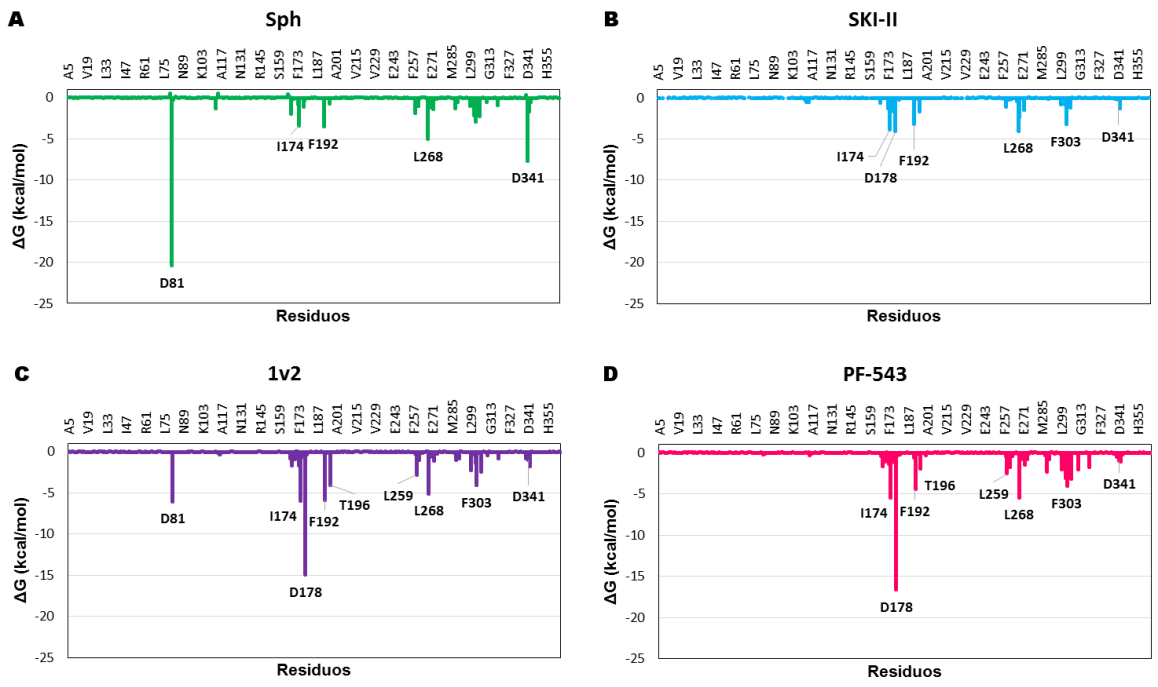


Fig. 10. Histogramas de descomposición por residuo para **(A) Sph**, **(B) SKI-II**, **(C) 1v2** y **(D) PF-543**. En cada caso, se resaltan los aminoácidos más importantes interactuantes en el complejo Ligando-Receptor.

Para la **Sph** se observa una marcada interacción con D81, entre otros (Figura 10A). Uno de los oxígenos del grupo carboxilo de D81 realiza dos enlaces puente de hidrógeno, uno de ellos con el hidrógeno del grupo hidroxilo del C1 de **Sph**, y permanece constante durante el 75,2% de la simulación. El otro enlace se establece entre el mismo oxígeno de D81 y un hidrógeno del grupo amino de **Sph**, manteniéndose formado por menor tiempo (40,8%) durante la simulación de DM (Figura 11A). Otra interacción notoria en el histograma de la Figura 10A es la de D341, la cual indica la presencia de otro enlace puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo y el grupo amino de **Sph**, que se mantiene estable durante 57,4% de la simulación (Figura 11A). También se encuentran interacciones importantes como por ejemplo aquellas con I174, F192 y L268, que interaccionan estabilizando la cadena hidrofóbica de **Sph**.

Volviendo a la descripción del apartado anterior, en cuanto a la unión de **Sph** en el bolsillo del sitio activo, podemos ver que durante la simulación de DM, la **Sph** se acomoda de tal manera que pierde las interacciones puente de hidrógeno con S168 y D178. Esto demuestra la importancia de las simulaciones de DM para establecer cuáles son aquellas interacciones que mantienen estabilizado el ligando en su sitio de unión.

En el caso de **SKI-II**, las interacciones son mucho menores y esto se condice con el hecho de que es el inhibidor más débil de la serie estudiada. En este histograma (Figura 10B) se destaca la aparición de la interacción

con D178, la cual es fundamental para el anclaje de los ligandos en el sitio activo. La interacción puente de hidrógeno ocurre entre el oxígeno del grupo carboxilo de D178 y el hidrógeno del grupo amino de **SKI-II**. Este enlace se puede observar en el 39,5% del transcurso de la dinámica (Figura 11B). También se establece un puente hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amino de G269 y el oxígeno del grupo hidroxilo de **SKI-II**, el cual se conserva durante el 31,6% de la DM. Por otra parte, I174, F192, L268 y F303 estabilizan el ligando interactuando en la zona no polar del sitio activo. Si bien en rasgos generales no posee interacciones muy fuertes, éstas desempeñan un efecto cooperativo y son más que suficientes para hacerlo funcionar como un potente inhibidor.

Al comparar la Figura 6A (**SKI-II** complejo cristalizado) y la Figura 11B (complejo obtenido luego de 50 ns de DM) podemos notar un desplazamiento del ligando dentro del sitio activo. La interacción entre el hidroxilo de **SKI-II** con D178 se rompe para formarse un puente de hidrógeno con el grupo amino del ligando. Este deslizamiento del inhibidor puede deberse posiblemente a su pequeño tamaño que difiere con el gran volumen que posee el bolsillo de unión. Esto puede apreciarse claramente en la Figura 6A donde queda en evidencia la diferencia de tamaños entre el inhibidor y la **Sph**.

En el inhibidor **1v2** podemos apreciar una marcada interacción tanto con D81 como con D178 (Figura 10C). Estos dos residuos sirven de anclaje para el ligando y no permiten que se mueva durante toda la simulación. Como puede apreciarse en la Figura 12A, **1v2** se encuentra estabilizado por D81, formando un puente de hidrógeno que se mantiene durante la totalidad de la dinámica. D178 forma dos enlaces puente de hidrógeno con **1v2** pero no son tan estables como el anterior (Figura 12A). Por otra parte, T196 establece un enlace puente de hidrógeno con el hidrógeno del grupo amino de **1v2**, el cual está presente en el 88,9% de la simulación. Además, **1v2** realiza interacciones del tipo π-stacking con F192 y F303 e interacciones de van der Waals con I174, L259, L268 y M306, entre otros aminoácidos.

Por último analizamos a **PF-543**, el inhibidor de SphK1 más potente reportado hasta la fecha. Notamos en la Figura 10D que **PF-543** no posee interacciones significativas con D81, pero si con D178, el cual es un residuo crucial en el anclaje del ligando dentro del sitio catalítico. D178 forma dos puentes de hidrógeno con un oxígeno de su grupo carboxilo: con el hidrógeno del anillo de pirrolidina (69,4%) y con el hidrógeno del grupo oxhidrilo (49,9%). Además, encontramos una interacción de tipo π-stacking con F303, que también actúa junto con I174, L259, L268, F288 y M306 estabilizando al ligando en la parte hidrofóbica del sitio de unión (Figura 12B).

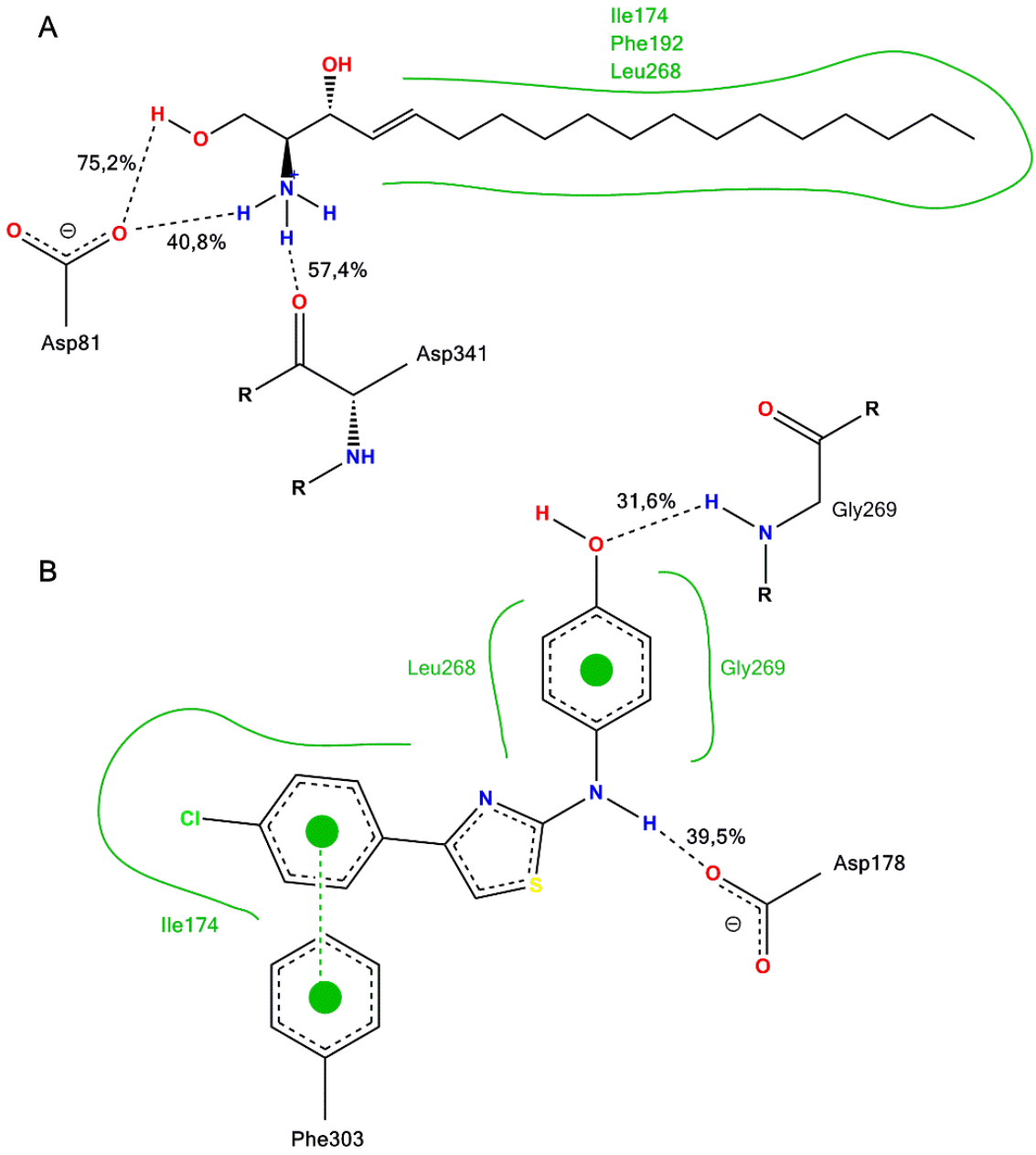


Fig. 11. Gráfico en dos dimensiones de **Sph (A)** y **SKI-II (B)** con los principales aminoácidos que estabilizan el complejo L-R. Estas representaciones fueron obtenidas mediante un servidor online (https://proteins.plus/) utilizando el PDB de la estructura más representativa obtenida luego de un proceso de clusterización aplicado a los 40 ns de simulación por triplicado para cada complejo. En la imagen, también se resaltan con líneas punteadas los enlaces puente de hidrógeno más importantes con el porcentaje de tiempo que permanecen formados durante la simulación de MD. Este valor fue obtenido utilizando el paquete *ptraj* de Amber14.

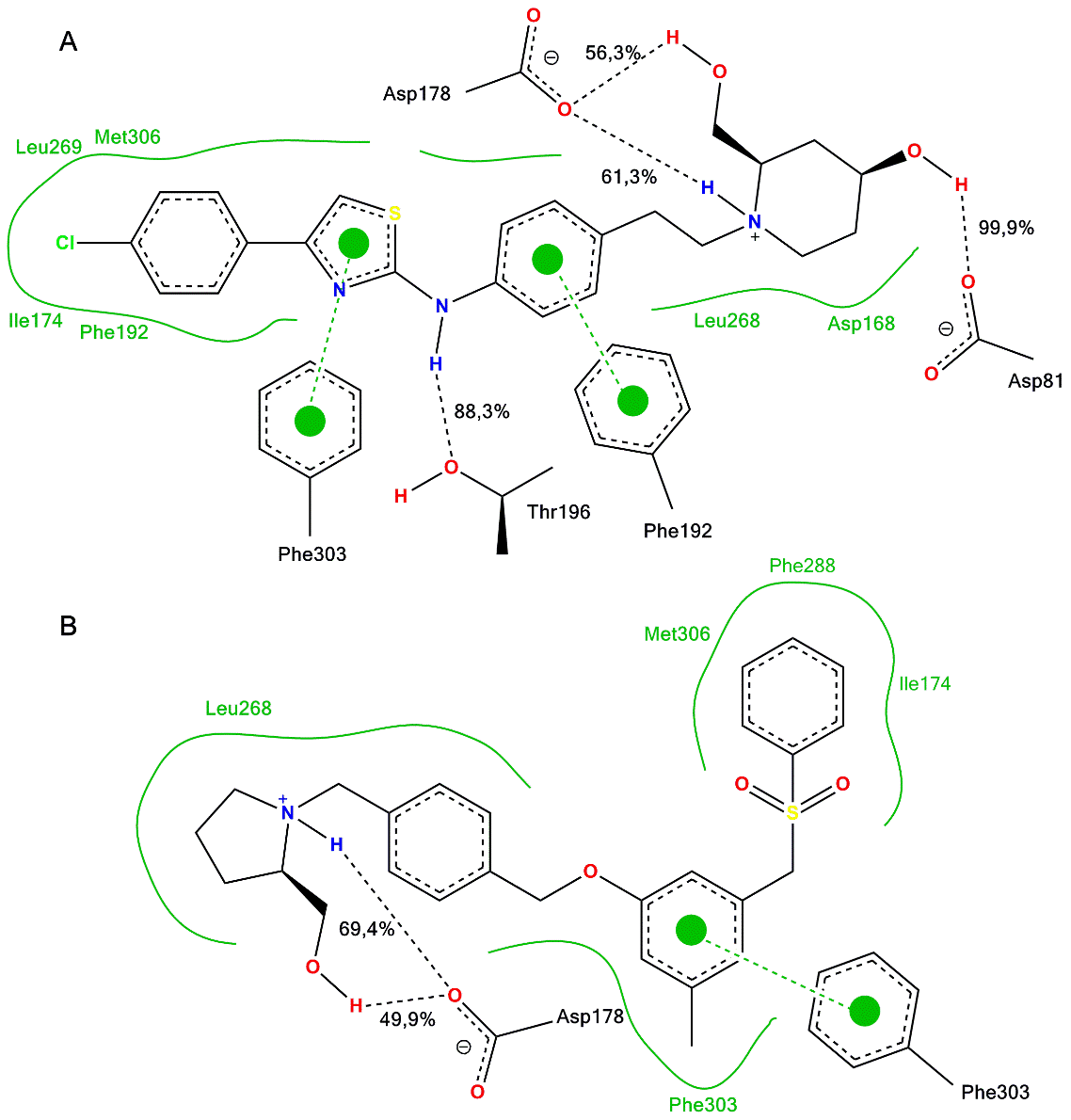


Fig. 12. Gráfico en dos dimensiones de **1v2 (A)** y **PF-543 (B)** con los principales aminoácidos que estabilizan el complejo L-R. Estas representaciones fueron obtenidas mediante un servidor online (https://proteins.plus/) utilizando el PDB de la estructura más representativa obtenida luego de un proceso de clusterización aplicado a los 40 ns de simulación por triplicado para cada complejo. En la imagen, también se resaltan con líneas punteadas los enlaces puente de hidrógeno más importantes con el porcentaje de tiempo que permanecen formados durante la simulación de MD. Este valor fue obtenido utilizando el paquete *ptraj* de Amber14.

3.4. Docking Molecular

En esta parte del trabajo se intentó analizar qué tan confiable es el método de docking elegido para corroborar el lugar preciso donde se ubican

los ligandos dentro del sitio activo. Para esto se llevó a cabo un proceso de autodocking utilizado el programa AutoDock[26] y AutoDock Vina[27].

El programa AutoDock realiza un examen más exhaustivo y preciso que AutoDock Vina, pero este último es muy útil para realizar búsquedas con grandes bibliotecas de compuestos, dado su agilidad y rapidez para obtener resultados. Ambos programas dieron resultados muy similares que se visualizan en la Figura 13.

Como se puede apreciar en la Figura 13, esto método de docking predice de manera acertada la ubicación de todos los ligandos dentro del sitio activo. No se observa casi diferencia con respecto a valores de RMSD (del inglés Root-mean-square deviation, o Distancia media cuadrática mínima) en ninguno de los casos estudiados. **Sph** tiene la mayor discrepancia con un RMSD de 1,448 Å, sigue **PF-543** con 1,171 Å, **1v2** con 0,425 Å y por último, **SKI-II** con 0,119 Å.

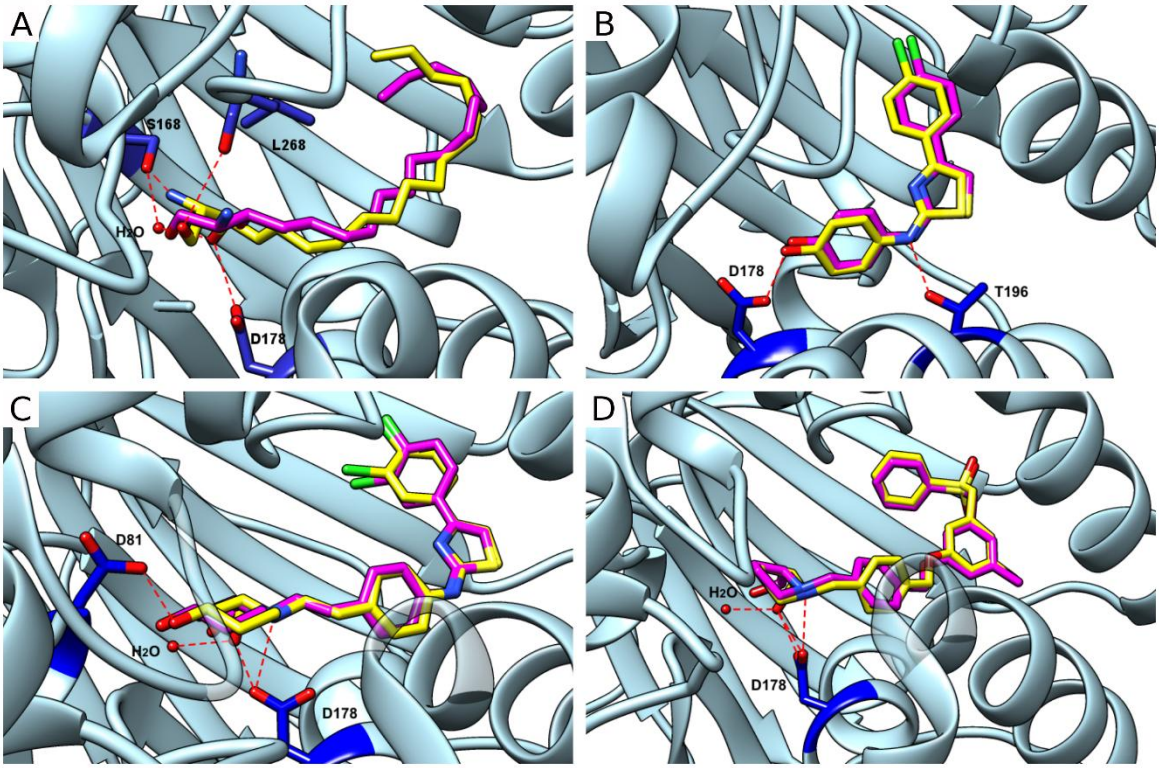


Fig. 13. Vista espacial de **Sph (A)**, **SKI-II (B)**, **1v2 (C)** y **PF-543 (D)** ubicada en el sitio activo SphK1. Se representa en cada caso, con color amarillo la estructura cristalina (código PDB: 3VZB, 3VZD, 4L02 y 4V24, respectivamente) y en color magenta la mejor disposición del ligando obtenida mediante estudios de docking utilizando el programa Autodock. Se resaltan con línea de puntos color rojo las interacciones puente de hidrógeno más importantes entre el ligando y los residuos del sitio activo.

Por otra parte, cabe mencionar que los valores scoring obtenidos fueron de -7,3 para **Sph**, -8,8 para **SKI-II**, -11,5 para **1v2** y -12,3 para **PF-543**. De acuerdo con estos valores, se puede graficar una curva de regresión lineal donde el R^2 obtenido es de 0,96. Esto indica, de manera preliminar,

que se mantiene una relación lineal entre los valores scoring obtenidos mediante esta técnica y el valor de concentración inhibitoria media de cada ligando. Con esto podemos concluir, que tanto AutoDock como AutoDock Vina son herramientas muy útiles para la búsqueda de nuevas estructuras que sirvan como posibles inhibidores de SphK1.

3.5. Conclusiones

En esta sección, se estudió la estructura general de la proteína, así como las interacciones más importantes para la unión de los diferentes inhibidores. Dado que en la bibliografía solo se encuentran datos de las interacciones presentes en las estructuras de rayos X de los complejos, se decidió llevar a cabo un análisis más exhaustivo utilizando simulaciones de dinámica molecular. Posteriormente y una vez realizadas las simulaciones de DM, se efectuaron múltiples análisis de las trayectorias para comprender mejor cuáles son los residuos que actúan como estabilizantes o desestabilizantes de los diferentes complejos ligando-proteína.

Para el caso de **Sph**, se puede señalar que su interacción principal con D178 se pierde durante la trayectoria y se conserva fija en el bolsillo de unión gracias a la interacción de D81, la cual se mantiene durante gran parte de la DM.

SKI-II es un inhibidor de pequeño tamaño molecular, y por esto su movilidad es mayor dentro del sitio activo. Sus interacciones no poseen energías muy altas pero son lo suficientemente importantes para convertirlo en un eficaz inhibidor. Es el único ligando estudiado que parece desplazarse dentro del sitio activo, moviéndose a la región polar del mismo. Con este deslizamiento, se modifican sus interacciones principales, donde deja de formar un enlace puente de hidrógeno entre el oxígeno de D178 y el hidrógeno del grupo fenol, para formarlo con el hidrógeno del grupo amino.

Para **1v2**, las simulaciones de DM permiten determinar los puentes de hidrógeno que mantienen estabilizado el ligando durante toda la trayectoria, siendo D81 y D178 los principales protagonistas de estas interacciones.

PF-543, el ligando más efectivo reportado hasta la fecha, no posee interacciones fuertes con D81. D178 es el principal residuo estabilizante de este ligando, formando dos enlaces puentes de hidrógeno con el inhibidor. F303 también aporta una gran contribución estabilizante mediante interacciones π-stacking y de Van der Waals.

Por último, es importantes remarcar los excelentes resultados obtenidos con la técnica de docking utilizando los programas AutoDock y AutoDock Vina. Los resultados de los cálculos de RMSD muestran valores menores a 1,5 Å para todos los casos estudiados. Esto demuestra que, en este sistema, existe una buena posibilidad de determinar la posición donde se situarán potenciales inhibidores de la SphK1.

3.6. Referencias

(1) Bossemeyer, D. Protein Kinases--Structure and Function. *FEBS Lett.* **1995**, *369* (1), 57–61.

(2) Labesse, G.; Douguet, D.; Assairi, L.; Gilles, A. M. Diacylglyceride Kinases, Sphingosine Kinases and NAD Kinases: Distant Relatives of 6-Phosphofructokinases. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27* (6), 273–275.

(3) Miller, D. J.; Jerga, A.; Rock, C. O.; White, S. W. Analysis of the Staphylococcus Aureus DgkB Structure Reveals a Common Catalytic Mechanism for the Soluble Diacylglycerol Kinases. *Structure* **2008**, *16* (7), 1036–1046.

(4) Kohama, T.; Olivera, A.; Edsall, L.; Nagiec, M. M.; Dickson, R.; Spiegel, S. Molecular Cloning and Functional Characterization of Murine Sphingosine Kinase. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 23722–23728.

(5) Taha, T. A.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Sphingosine Kinase: Biochemical and Cellular Regulation and Role in Disease. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *39* (2), 113–131.

(6) Nava, V. E.; Lacana', E.; Poulton, S.; Liu, H.; Sugiura, M.; Kono, K.; Milstien, S.; Kohama, T.; Spiegel, S. Functional Characterization of Human Sphingosine Kinase-1. *FEBS Lett.* **2000**, *473* (1), 81–84.

(7) Melendez, A. J.; Carlos-Dias, E.; Gosink, M.; Allen, J. M.; Takacs, L. Human Sphingosine Kinase: Molecular Cloning, Functional Characterization and Tissue Distribution. *Gene* **2000**, *251* (1), 19–26.

(8) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.-H.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; et al. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(9) Gustin, D. J.; Li, Y.; Brown, M. L.; Min, X.; Schmitt, M. J.; Wanska, M.; Wang, X.; Connors, R.; Johnstone, S.; Cardozo, M.; et al. Structure Guided Design of a Series of Sphingosine Kinase (SphK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4608–4616.

(10) Wang, J.; Knapp, S.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Elkins, J. M. Crystal Structure of Sphingosine Kinase 1 with PF-543. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (12), 1329–1333.

(11) Ishii, I.; Fukushima, N.; Ye, X.; Chun, J. Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73* (1), 321–354.

(12) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; et al. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(13) Hanukoglu, I. Proteopedia: Rossmann Fold: A Beta-Alpha-Beta Fold at Dinucleotide Binding Sites. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2015**, *43* (3), 206–209.

(14) Cheek, S.; Ginalski, K.; Zhang, H.; Grishin, N. V. A Comprehensive Update of the Sequence and Structure Classification of Kinases. *BMC Struct. Biol.* **2005**, *5*, 6.

(15) Topham, M. K.; Epand, R. M. Mammalian Diacylglycerol Kinases: Molecular Interactions and Biological Functions of Selected Isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790* (6), 416–424.

(16) Garavaglia, S.; Raffaelli, N.; Finaurini, L.; Magni, G.; Rizzi, M. A Novel Fold Revealed by Mycobacterium Tuberculosis NAD Kinase, a Key Allosteric Enzyme in NADP Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (39), 40980–40986.

(17) Liu, J.; Lou, Y.; Yokota, H.; Adams, P. D.; Kim, R.; Kim, S.-H. Crystal Structures of

an NAD Kinase from Archaeoglobus Fulgidus in Complex with ATP, NAD, or NADP. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354* (2), 289–303.

(18) Mori, S.; Yamasaki, M.; Maruyama, Y.; Momma, K.; Kawai, S.; Hashimoto, W.; Mikami, B.; Murata, K. NAD-Binding Mode and the Significance of Intersubunit Contact Revealed by the Crystal Structure of Mycobacterium Tuberculosis NAD kinase–NAD Complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327* (2), 500–508.

(19) Poncet-Montange, G.; Assairi, L.; Arold, S.; Pochet, S.; Labesse, G. NAD Kinases Use Substrate-Assisted Catalysis for Specific Recognition of NAD. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (47), 33925–33934.

(20) Bakali, H. M. A.; Herman, M. D.; Johnson, K. A.; Kelly, A. A.; Wieslander, A.; Hallberg, B. M.; Nordlund, P. Crystal Structure of YegS, a Homologue to the Mammalian Diacylglycerol Kinases, Reveals a Novel Regulatory Metal Binding Site. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (27), 19644–19652.

(21) Nichols, C. E.; Lamb, H. K.; Lockyer, M.; Charles, I. G.; Pyne, S.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. Characterization of Salmonella Typhimurium YegS, a Putative Lipid Kinase Homologous to Eukaryotic Sphingosine and Diacylglycerol Kinases. *Proteins* **2007**, *68* (1), 13–25.

(22) McPherson, A. Introduction to Protein Crystallization. *Methods* **2004**, *34* (3), 254–265.

(23) Miller, B. R. 3rd; McGee, T. D. J.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3314–3321.

(24) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; et al. *{Amber 14} OR - University of California, San Francisco*; 2014.

(25) Gohlke, H.; Kiel, C.; Case, D. A. Insights into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS Complexes. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330* (4), 891–913.

(26) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

(27) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.

Capítulo 4

Estudio integrador para identificar nuevos inhibidores de SphK1 con diferentes andamiajes estructurales

4.1. Introducción

En vista de la importancia de la esfingosina quinasa como nuevo blanco molecular, en este capítulo se describe como se realizó la búsqueda de nuevos inhibidores para esta enzima que poseen diferentes andamiajes estructurales a los inhibidores conocidos.

Anteriormente, varios compuestos se han reportado con actividad inhibitoria en SphK1[1–8]. Los andamiajes estructurales de los compuestos más conocidos se muestran en la Figura 1, con sus respectivas referencias. Recientemente, se reveló la estructura cristalina de SphK1 con **PF-543**, el inhibidor de SphK1 más potente y selectivo reportado hasta la fecha[7,9]. Si bien se han estudiado numerosos inhibidores específicos y no específicos de la isoenzima SphK1, teniendo en cuenta el importante papel de esta enzima en los procesos inflamatorios relacionados con el cáncer[10–13], resulta muy importante desarrollar nuevos inhibidores de SphK1, en lo posible más potentes, con diferentes andamiajes estructurales a aquellos de los inhibidores conocidos. Por lo tanto, el objetivo principal de esta parte del Trabajo de Tesis Doctoral fue obtener nuevos inhibidores de SphK1 que tengan una base estructural diferente a los inhibidores ya conocidos. Para obtener estos nuevos compuestos se utilizó como estrategia la realización de un cribado virtual. Así, el primer paso del estudio se centró en analizar las estructuras cristalinas de SphK1 en su estado apo[14] y complejado con diferentes inhibidores[1,9]. Posteriormente, se llevó a cabo un cribado virtual que permitió identificar posibles nuevos inhibidores. A continuación, se sintetizaron estas nuevas moléculas para luego comprobar su actividad inhibidora frente a SphK1. Finalmente, se realizó un estudio de modelado molecular que permitió comprender las interacciones a nivel molecular que estabilizan la formación de los diferentes complejos Ligando-Receptor. La Figura 2 muestra en forma esquemática los diversos pasos que se llevaron a cabo en este estudio.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Cribado virtual basado en la estructura

Las estrategias de cribado virtual basado en la estructura (Structure-based Virtual Screening (SBVS)) se basan en utilizar la estructura tridimensional de un blanco molecular y en la capacidad de los algoritmos de docking para predecir el modo de enlace y las afinidades de unión de

diferentes compuestos disponibles en bibliotecas[15]. El proceso de cribado generalmente se divide en dos pasos principales: primero, la correcta colocación del ligando en el sitio de unión de la proteína; y luego la estimación de la afinidad del ligando por medio de una función de puntuación o scoring[16].

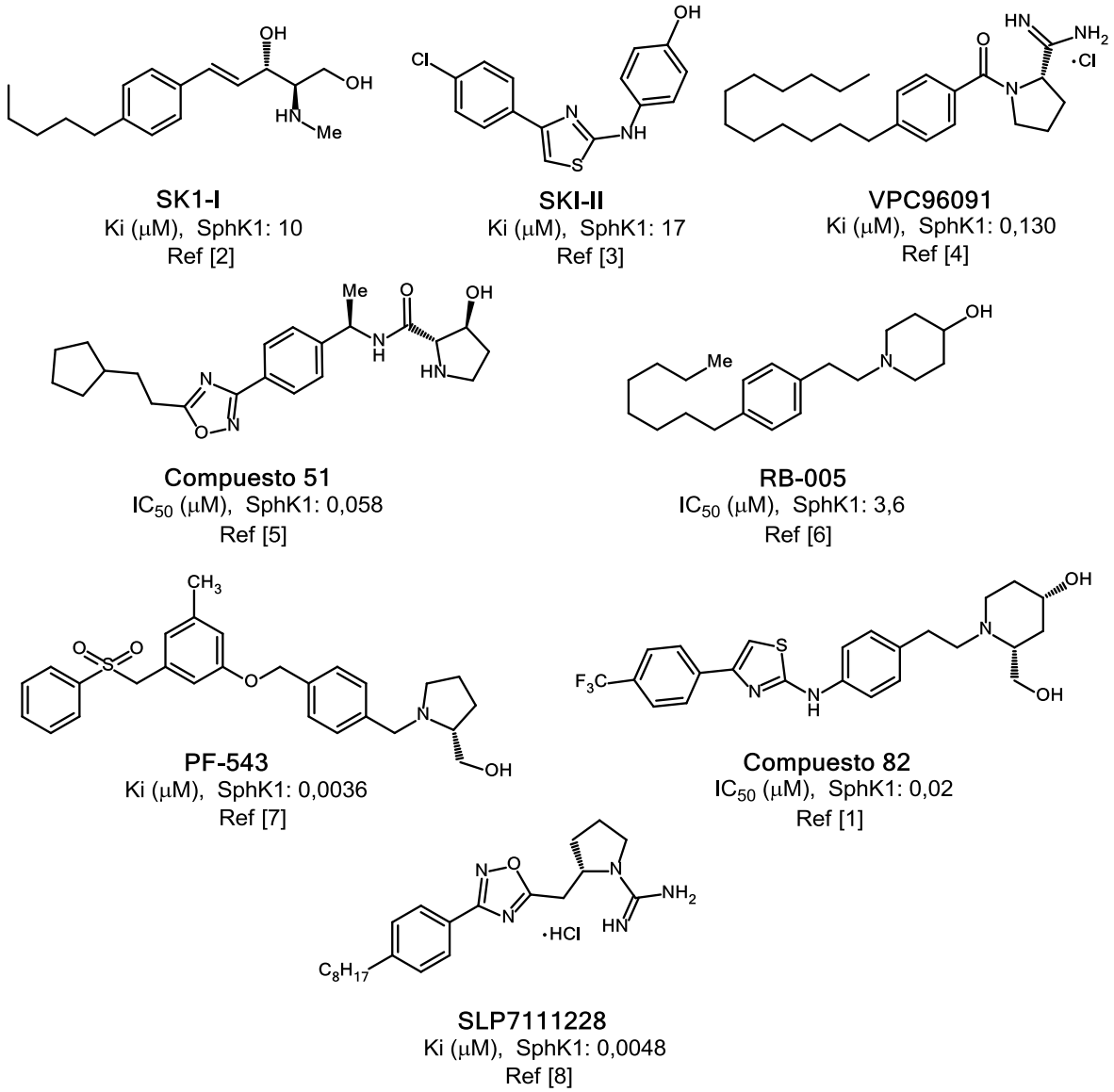


Fig. 1. Principales andamiajes estructurales previamente reportados como inhibidores de SphK1.

Antes de llevar a cabo los posibles estudios de cribado virtual para buscar nuevos inhibidores de SphK1, se consideró prudente evaluar el rendimiento del algoritmo de cribado, para recuperar los inhibidores conocidos de SphK1 de una biblioteca de señuelos. Hay dos tratamientos para construir estas bibliotecas, en el enfoque más común, algunos compuestos activos son las semillas en una base de datos más grande de

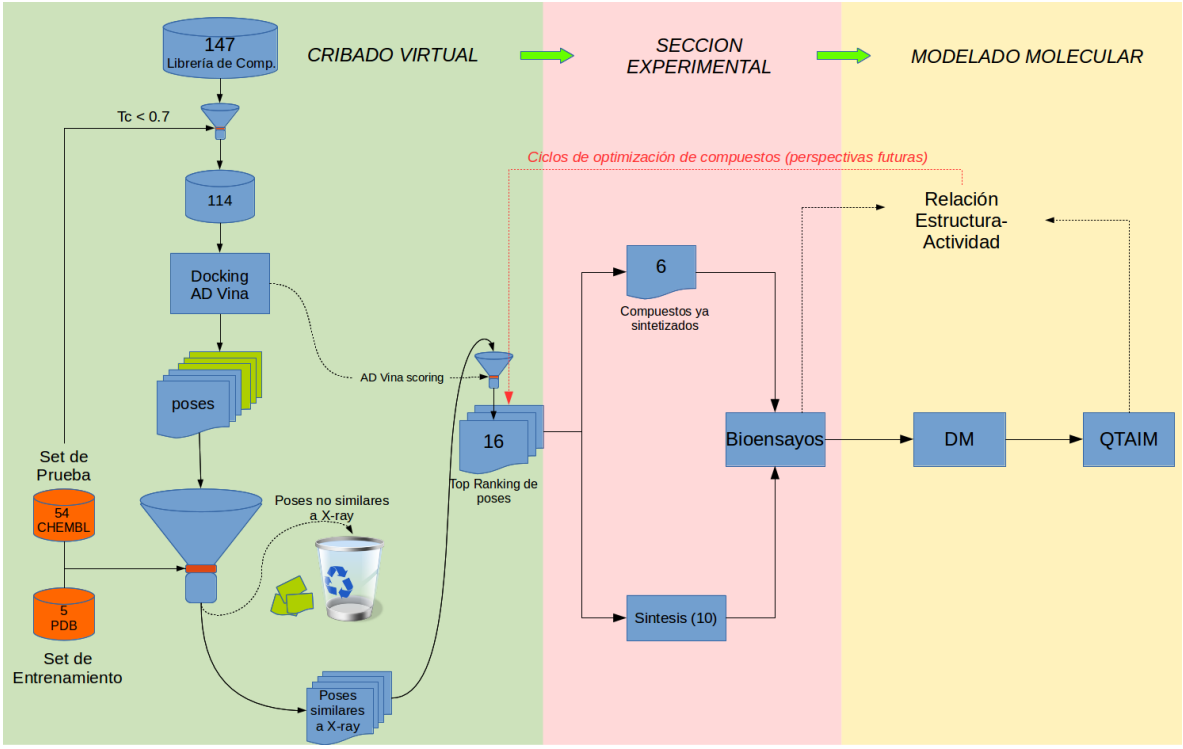


Fig. 2. Diagrama de flujo que muestra en forma esquemática los diversos pasos y técnicas llevadas a cabo en este estudio. Los números dentro de los cuadros indican la cantidad de compuestos evaluados.

moléculas seleccionadas al azar (y supuestamente inactivas) con propiedades fisicoquímicas similares pero con topologías 2D diferentes. Sin embargo, en la química medicinal real, las moléculas a menudo son análogas, ya que provienen de una síntesis paralela y, en consecuencia, son estructuralmente similares entre sí. Por lo tanto, otro enfoque más razonable en este caso es seleccionar señuelos de acuerdo a su similitud con las moléculas activas[17]. De esta manera se construyó una biblioteca de señuelos para evaluar el rendimiento del cribado siguiendo este segundo tratamiento. Dado que en este procedimiento, los señuelos son más propensos a ser activos que las moléculas seleccionadas al azar, uno necesita estar seguro que son realmente inactivos. Por lo tanto, se deben conocer sus actividades biológicas contra el objetivo de interés. En consecuencia, se compiló un conjunto de datos de 54 compuestos de CHEMBL (www.ebi.ac.uk/chembl/)[18] para los cuales se conocen sus constantes de inhibición medidas experimentalmente (valores de Ki) contra SphK1. Los compuestos se clasificaron de los más activos a los menos activos según sus valores de Ki. El valor de corte se estableció en 10.000 nM, donde los compuestos con valores superiores o inferiores a este umbral se marcaron como inactivos o activos respectivamente. El valor de corte elegido asegura una población equilibrada de compuestos activos/inactivos.

Después de examinar la biblioteca con AutoDock Vina[19], se construyó una curva Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating

Characteristic (ROC)) para evaluar la calidad de los resultados del cribado[17]. Esta curva se construyó trazando la Tasa de Verdaderos Positivos (o Sensibilidad) *versus* la Tasa Falsos Positivos (o 1-Especificidad) calculada sobre la lista ordenada de los puntajes o scoring del cribado. La curva ROC se representa en la Figura 3 para los resultados del cribado virtual en uno de las conformaciones de SphK1 resuelta experimentalmente, 3vzd_A_chainA (véase la sección de cribado cruzado a continuación para obtener detalles sobre el nombre de las conformaciones de las proteínas). En este gráfico, la diagonal a 45º (línea gris) representa una clasificación aleatoria de la base de datos con un área bajo la curva (AUC) igual a 0,5. Cualquier modelo con un AUC > 0,5 se comporta mejor que un modelo al azar, al discriminar los compuestos más activos de los menos activos. Como se observa en la figura, el modelo de cribado virtual funciona muy bien en la clasificación del conjunto de datos (AUC = 0,87). Se obtuvieron resultados similares para las estructuras restantes que hay disponibles para SphK1.

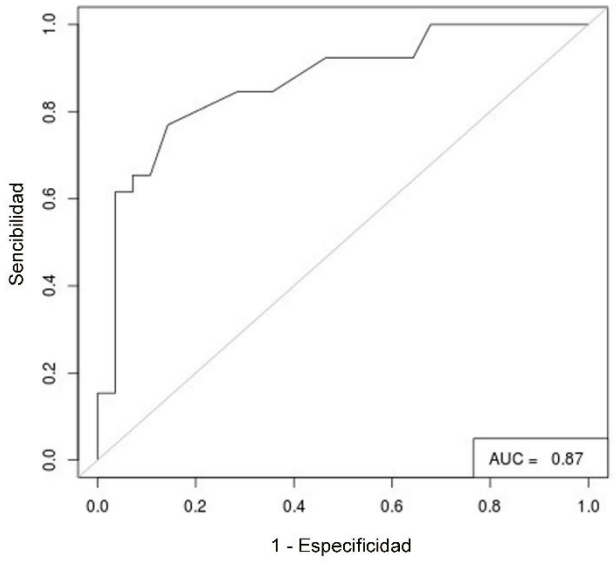


Fig. 3. Rendimiento para el cribado de los 54 inhibidores conocidos de SphK1 en el confórmero 3vzd_A_chainB.

La Figura 4a muestra la mejor pose para cada uno de los 54 inhibidores conocidos de SphK1 acoplados en el mismo confórmero de proteína 3vzd_A_chainB. Si bien no hay información estructural sobre cómo estos inhibidores realmente se unen a SphK1, comparten los mismos andamiajes estructurales que los cuatro ligandos en las estructuras resueltas y, por lo tanto, se supone que se unirán también mediante el mismo modo de unión. Tal como se representa en la Figura 4, la mayoría de los inhibidores adoptan el modo de unión en forma de J característico observado para los ligandos cristalográficos. Sin embargo, se pueden observar algunas conformaciones atípicas entre las poses: algunos de ellos no entran completamente en la cavidad en forma de J y se solapan con el

sitio de unión de ADP y algunos ligandos se invierten, es decir, tienen sus cabezas polares ancladas en la parte interna del bolsillo y sus colas hidrofóbicas cerca de la entrada de la cavidad en forma de J.

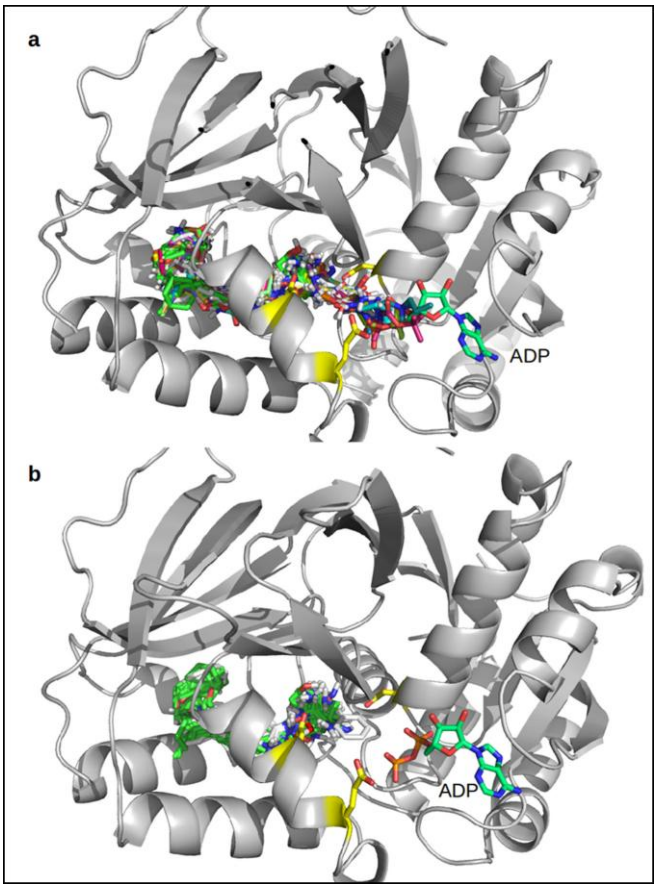


Fig. 4. Modos de enlace de los 54 inhibidores conocidos de SphK1 antes **(a)** y después **(b)** de la filtración de las poses "no similares a las estructuras de rayos X".

Por lo tanto, aunque la función de puntuación de AutoDock Vina funciona bien en la discriminación entre ligandos más activos y menos activos, la capacidad del algoritmo de cribado para recuperar las poses correctas del ligando es algo deficiente.

4.2.2. Cribado cruzado

En muchos estudios se ha evaluado la tasa de éxito de los programas en las pruebas de autodocking, mediante el cual un ligando se acopla a la estructura de la proteína de la cual fue extraída (acoplamiento nativo). El llamado cribado cruzado (cross-docking), o el uso de una estructura de proteínas de un complejo que contiene un ligando diferente, proporciona una evaluación más realista de la capacidad de un modelo de cribado para reproducir resultados de rayos X[20].

Para evaluar la capacidad del algoritmo de cribado para recuperar las posturas correctas de los ligandos conocidos de SphK1, se realizó un análisis de cribado cruzado de los complejos cristalográficos de SphK1 disponibles hasta la fecha. Actualmente, hay cinco estructuras cristalinas de SphK1 depositadas en el banco de datos de proteínas (Protein Data Bank www.rcsb.org/) que se muestran en la Figura 5a. En uno, SphK1 se cristalizó tanto en forma de apo (código 3vzb, cadena C)[14] como en complejo con un sustrato **SQS** correspondiente a **esfingosina** (código 3vzb, cadenas A, B). En las estructuras restantes, SphK1 se resolvió complejada con un inhibidor moderado, **SKI-II** (no isoenzimático y específico para SphK1) en presencia de ADP (3vzd) y ausencia de ADP (código 3vzc) y complejada con dos inhibidores potentes, **1v2** (código 4l02)[1] y **PF-543** (código 4v24)[9].

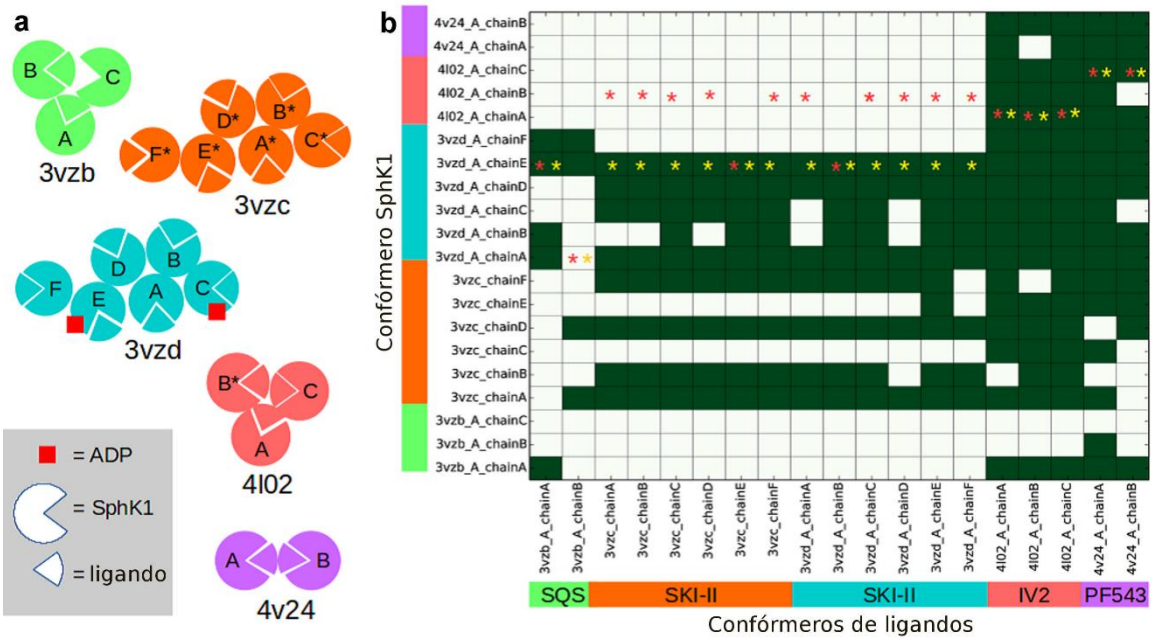


Fig. 5. (a) Representación esquemática de las 5 estructuras cristalinas disponibles para SphK1. Este esquema pretende ilustrar el número y la disposición de las cadenas dentro de cada estructura, así como la composición estequiométrica de cada cadena (ligando unido /no unido, unido a ADP/estados no ligados). En las estructuras 3vzb, 4l02 y 4v24, los sitios de unión del ligando de cada cadena se empaquetan uno contra el otro, mientras que en las estructuras 3vzc y 3vzd, los sitios de unión apuntan hacia afuera desde la unidad asimétrica. Las cadenas etiquetadas con una estrella carecen de algunos residuos en el ciclo que conectan las hélices α7 y α8 (ver abajo). **(b)** Realización del experimento de cribado cruzado. Las posiciones de cribado de rango superior con un RMSD ≤ 2 con respecto al modo de enlace cristalográfico en cada cadena se representan en verde. Las estrellas rojas y amarillas indican el mejor confórmero de proteína puntuada para cada ligando antes y después de filtrar la disposición "no similar a rayos X", respectivamente.

Cuatro de las estructuras, 3vzb, 3vzd, 4l02 y 4v24 contienen conformaciones alternativas "A" y "B" para algunos residuos. Como ninguno de los residuos con conformaciones alternativas estaba cerca de

la cavidad del sustrato, solo se mantuvo la conformación "A" de esas estructuras. Además, mientras que SphK1 es monomérica (en su ensamble biológico), la unidad asimétrica en las estructuras cristalinas contiene de 2 a 5 cadenas dependiendo de la estructura (ver Figura 5a). Dado que la unidad asimétrica constituye la porción repetitiva más pequeña del cristal y debido a la diferente estequiometría de las cadenas dentro de la misma estructura (es decir, la forma apo, unida al ligando, unida al ligando + ADP, véase la Figura 5a), las diferencias estructurales pueden ser observadas entre las cadenas en una sola estructura cristalina. En 19 de las 20 cadenas o confórmeros de SphK1, había un ligando unido a la cavidad del sustrato en el dominio C-terminal. Por lo tanto, se realizó el cribado cruzado de los 19 ligandos contra las 20 conformaciones de proteínas de las cinco estructuras cristalinas.

Para la denominación de los diferentes confórmeros de SphK1, se adoptó la siguiente convención: "PDB id_X_chainY", donde PDB id es el código de cuatro dígitos con el que se deposita la estructura 3D en Protein Data Bank (www. rcsb.org); X la conformación alternativa (es decir: A, B, etc.); e Y corresponde a la cadena de proteína (cadena A, cadena B, etc.).

Antes de los cálculos de cribado cruzado, los veinte confórmeros de SphK1 se superpusieron por sus carbonos alfa. Luego, cada ligando de cada estructura cristalina se acopló transversalmente contra todos los confórmeros de la proteína. Después del cribado, se calculó el RMSD entre el modo de unión experimental de cada confórmero de ligando y su pose acoplada en cada uno de los veinte confórmeros de proteína. El mapa de color binario en la Figura 5b resume los resultados del experimento de cribado cruzado.

Como se puede ver, **PF-543** y **1v2** están incrustados en la pose de unión experimental propuesta en la mayoría de los confórmeros proteicos. Por otro lado, **SKI-II** y **SQS** en general reproducen la postura experimental solo en sus confórmeros nativos y/o en un subconjunto más pequeño de confórmeros proteicos.

El bajo rendimiento del cribado cruzado de **SQS** y **SKI-II** en sus confórmeros no nativos sugiere que pueden tener lugar ciertos cambios conformacionales en la enzima, que son impulsados por las características del ligando (efectos de ajuste inducido). Esto también se evidencia por el hecho de que ninguno de los ligandos se acopla bien en la forma apo de la enzima (cadena C de 3vzb).

El análisis de la forma apo (cadena C de 3vzb) reveló una cavidad en forma de “J” conformada en forma similar a la de la holoenzima (enzima unida al ligando). Sin embargo, su volumen accesible al solvente disminuyó marcadamente al pasar de la forma apo a la forma holo debido al movimiento hacia adentro de las hélices α7 y α8 (Figura 6a). Según lo sugerido por Wang et. al.[14], el segmento α7-α8 en la SphK1 podría actuar

como una compuerta lipídica que controla la entrada y salida del sustrato lipídico y del producto.

Para ilustrar la importancia de los cambios conformacionales en la SphK1, se consideró la estructura cristalina de SphK1 unida a **SQS** superpuesta a la estructura de SphK1 unida a **SKI-II**, como se muestra en la Figura 6b. Como puede verse, la "puerta α7-α8" muestra una conformación ligeramente diferente en confórmeros unidos a **SKI-II** (verde) y **SQS** (naranja). Como consecuencia de esta diferencia conformacional, cuando **SKI-II** está unido al confórmero de proteína unida a **SQS**, no puede acercarse lo suficiente a la hélice α8 para formar el puente de hidrógeno con T196 porque V177 estaría ubicado demasiado cerca del anillo aminofenol de **SKI-II**, dando lugar a un impedimento estérico. La incapacidad de **SKI-II** para formar ese enlace puente de hidrógeno en el confórmero de **SQS**, podría explicar en parte, el bajo rendimiento del cribado cruzado de **SKI-II**. Por lo tanto, los cambios conformacionales en el segmento α7-α8, y el hecho de que el rendimiento del cribado es muy sensible a esos cambios, resalta la necesidad de emplear un conjunto de conformaciones de proteínas en los modelos de cribado virtual para SphK1.

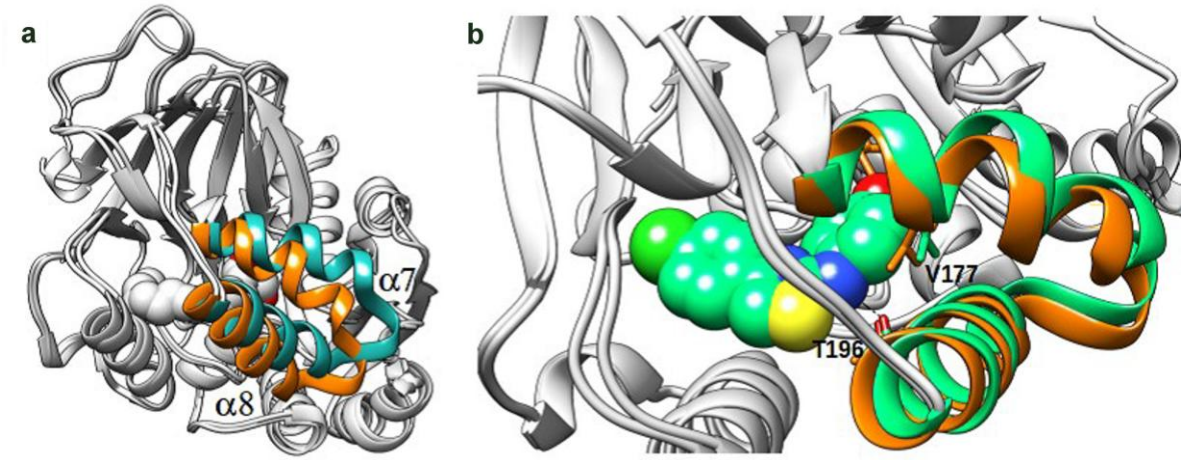


Fig. 6. (a) Estructura cristalina de SphK1 unida a **SQS** (en naranja) superpuesta a la forma apo de la enzima (en cian). **(b)** Estructura cristalina de SphK1 unida a **SQS** (en naranja) superpuesta a la estructura de rayos X de la enzima unida a **SKI-II** (en verde). Los átomos de **SKI-II** se representan con esferas para resaltar el impedimento estérico con V177 del confórmero de proteína unida a SQS.

4.2.3. Docking sobre múltiples conformaciones de la enzima o "conjunto de acoplamiento"

En el docking sobre múltiples conformaciones de la enzima, el ligando es enfrentado a muchas conformaciones de la proteína, como una manera de incorporar flexibilidad en el receptor. El confórmero de mayor puntuación es luego seleccionado del conjunto de confórmeros. Por

consiguiente, seleccionamos la pose de puntuación más alta obtenida para cada uno de los 19 ligandos, que están marcados con una estrella roja en el mapa de la Figura 5b. Como se puede ver en esa figura, solo en 8 de los 19 ligandos (42% de los casos) fue una pose correcta (es decir, una pose con RMSD ≤ 2 Å) seleccionada por la función de puntuación estándar de AutoDock Vina[19]. Por lo tanto, es evidente que un estudio de docking sobre múltiples conformaciones para encontrar inhibidores novedosos de SphK1 probablemente fallaría si los compuestos "no similares a rayos X" (es decir, las poses con RMSD > 2 Å) no se filtran primero del conjunto. Por lo tanto, en la próxima sección se propone un modelo de clasificación que permite eliminar las poses “no similares a rayos X” (cuadros blancos en el mapa de la Figura 5b) del conjunto de poses observadas para cada ligando.

4.2.4. Un modelo para filtrar las poses “no similares a la de Rayos X”

Aprovechando la información estructural disponible para SphK1, se obtuvo un modelo de clasificación que fue capaz de distinguir las poses "similares a rayos X" de aquellas "no similar a rayos X" de acuerdo con un punto de corte de RMSD de 2 Å, con ~86% de precisión en el conjunto de entrenamiento. La Figura 7a muestra la forma de la hipótesis de regresión logística $h\theta(X)$ donde X y θ son vectores que contienen las variables independientes (o características) y los parámetros ajustables del modelo, respectivamente. El modelo, una vez ajustados los parámetros, estimó la probabilidad (entre 0 y 1) de la pose del docking de ser análoga a una pose similar a una estructura del cristal o una pose “similar a rayos X”, basada en los modos de unión del ligando de las estructuras resueltas experimentalmente de SphK1.

Las características para ajustar el modelo se seleccionaron a partir de los términos conformación-dependiente definidos en la función de puntuación de AutoDock Vina[19]. Los términos conformación-dependientes en la función de puntuación por defecto de AutoDock Vina consisten en: tres términos estéricos (gauss1, gauss2 y repulsión), un término de enlace de hidrógeno y un término hidrofóbico[19].

Para hacer las características independientes del tamaño del ligando, cada término se normalizó por el número de átomos pesados del ligando (HAC, por sus siglas en ingles de Heavy Atom Count), de modo que el modelo podría generalizarse a distintos ligandos de los que se encontraban en el conjunto de entrenamiento.

Al graficar los términos AutoDock Vina independientes del tamaño entre sí, encontramos que el término hidrofóbico era irrelevante para discriminar entre las poses "similares a rayos X" y "no similares a rayos X", por lo que se eliminó del conjunto de características potenciales para el modelo de clasificación. El término hidrofóbico explica la penalización de

desolvatación debido a la unión del ligando. Dado que tanto "similares a rayos X" como "no similares a rayos X" están bastante enterrados en el interior de proteína (véase la Fig. 4a), el término hidrofóbico no difiere apreciablemente entre ambos tipos de poses. De los restantes cuatro términos dependientes de la conformación, se construyó un nuevo conjunto de características teniendo en cuenta el significado físico de estos términos y el conocimiento obtenido de las estructuras resueltas experimentalmente de SphK1.

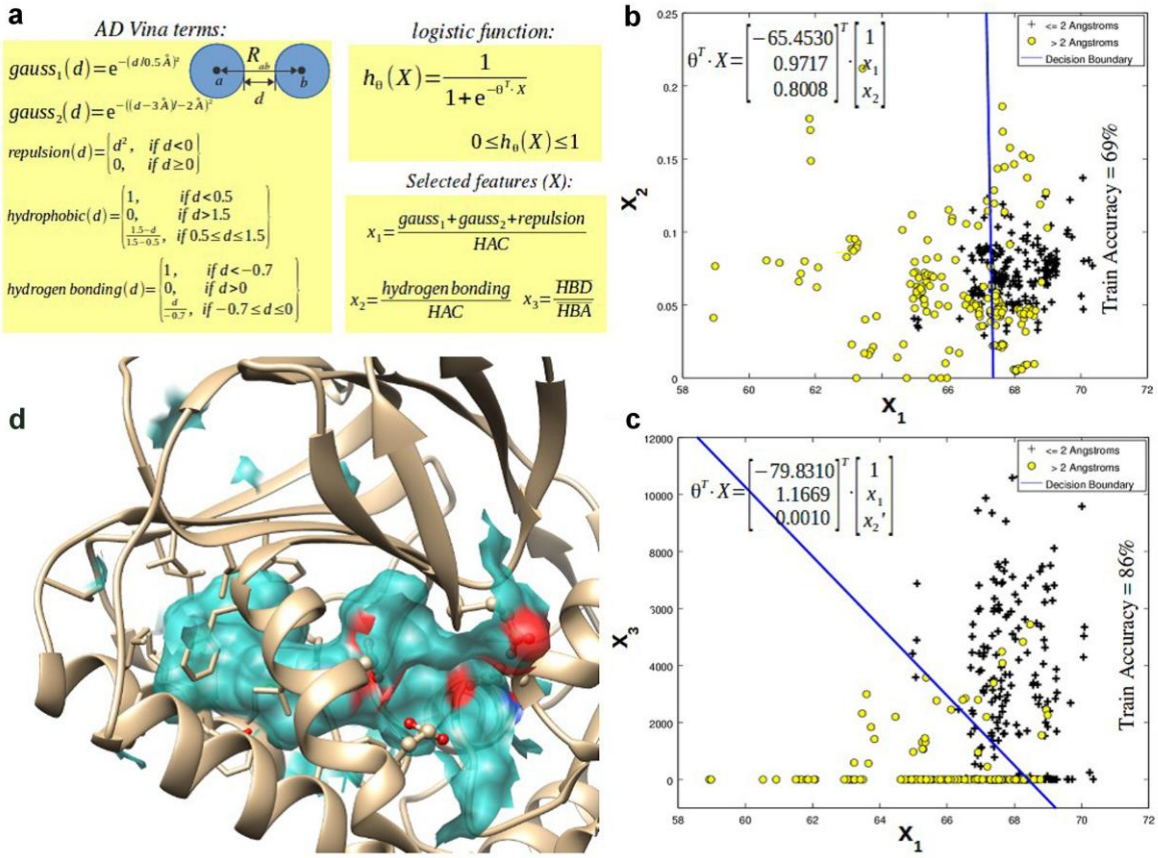


Fig. 7. Construcción del modelo de regresión logística para clasificar las poses del docking en "similares a la estructura de rayos X" o "no similares a la estructura de rayos X" en base a su similitud con el modo de unión de los ligandos en las estructuras cristalinas.

La Figura 7a muestra el nuevo conjunto de características construidas a partir de los términos originales de AutoDock Vina. Así, los tres términos estéricos (previamente normalizados por el HAC) se sumaron en un solo término x_1 basado en la observación de que estos tres términos juntos (es decir, los dos términos atractivos de Gauss para la dispersión y el término repulsivo) se comportan aproximadamente como los términos atractivos y repulsivos de Van der Waals en funciones de puntuación basadas en campos de fuerza (es decir, el potencial 12-6 de Lennard-Jones). El término estérico combinado (x_1), de manera similar a los términos de van der Waals, podría considerarse como una medida de la

“complementariedad de forma” entre el ligando y la cavidad de unión del receptor. Además de x_1, x_2 representa el término de enlace de hidrógeno de AutoDock Vina, normalizado por el número de átomos pesados. Finalmente, se construyó el término de enlace de hidrógeno alternativo x_3. A diferencia de x_2, x_3 discrimina entre los ligandos que actúan principalmente como dadores de hidrógeno de los que actúan como aceptores de hidrógeno. Por lo tanto, x_3 calcula la función de enlace de hidrógeno de AutoDock Vina para las interacciones que involucran ligandos con átomos de hidrógeno polares (HBD, Hydrogen Bond Donor) frente las interacciones que involucran átomos aceptores de hidrógeno del ligando (HBA, Hydrogen Bond Acceptor), cada uno normalizado por el número total de hidrógenos polares y aceptores de hidrógeno del ligando, respectivamente.

En la Figura 7b, x_1 se representa frente a x_2 con las posturas "similares a estructuras cristalinas" (RMSD $\leq$ 2 Å) y posturas "no similares a estructuras cristalinas" (RMSD $\geq$ 2 Å) representadas con cruces negras y círculos de color amarillo, respectivamente. El límite de decisión (línea azul) obtenido a partir del conjunto de parámetros del modelo entrenado, discrimina entre los dos tipos de poses con una precisión de 69 %. Por otro lado, cuando x_3 se usa para ajustar al modelo en lugar de x_2 (Figura 7c), el límite de decisión resultante se comporta mucho mejor al discriminar entre poses “similares a estructura cristalina” y “no similares a la estructura cristalina” con un 86% de precisión. Esta mejora en el rendimiento del modelo se relaciona con la simple observación de que los ligandos en las estructuras resueltas experimentalmente actúan casi exclusivamente como donantes de enlaces de hidrógeno contra los residuos cargados negativamente de la enzima. Esto da como resultado un valor muy alto de x_3 (y una relación HBD/HBA muy alta) en las poses de estructura similar a la cristalina y un valor muy bajo de x_3 de otro modo, lo que permite una mejor discriminación entre ambos tipos de poses.

La Figura 7d representa el túnel en forma de J ocupado por el ligando en el sitio de unión de la enzima. Como puede verse, los bordes del túnel en forma de J se definen principalmente por residuos hidrofóbicos y también por un conjunto de residuos cargados negativamente cerca de la entrada del túnel, incluidos D81 y D178, entre otros. Por lo tanto, el evento de reconocimiento molecular implica la “complementariedad de forma” entre el ligando y SphK1 que se evidencia por los valores generalmente más altos de x_1 en las poses similares a la estructura cristalina y también la “complementariedad de carga” que está mejor descripta por x_3.

Las estrellas amarillas en la Figura 5b muestran las poses de mayor puntuación para cada uno de los 19 ligandos después de filtrar las poses con estructura "no similar a rayos X" con el modelo logístico entrenado. En 18 de los 19 ligandos se seleccionó una pose de estructura similar a la de

un cristal, lo cual representaba una clara mejora en comparación con el rendimiento del experimento de "cribado cruzado" sin aplicar el filtro.

Con el fin de validar el modelo de clasificación, en la siguiente sección se probó el modelo de regresión logística sobre un nuevo conjunto de inhibidores de SphK1.

4.2.5. Validación del modelo

Para validar el modelo de clasificación obtenido, lo aplicamos a las poses cribadas de los 54 inhibidores conocidos de SphK1 de la base de datos CHEMBL para filtrar las estructuras "no similares a rayos X". La Figura 4b muestra las mejores poses marcadas para el confórmero de proteínas 3vzd_A_chainB, después de aplicar el modelo. Mediante la inspección visual de la Figura 4b, se puede ver que la mayoría de las poses de valores atípicos se eliminaron del conjunto de prueba después de filtrar las posturas "no similares a estructuras cristalinas".

4.2.6. Preselección de compuestos candidatos y resultados de la selección virtual

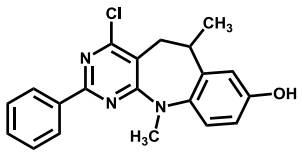
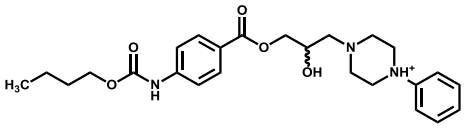
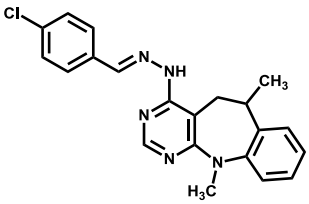
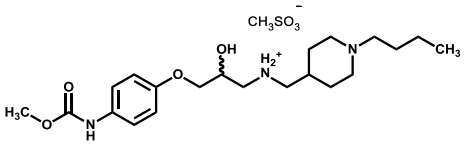
Desde el punto de vista de la estructura, los compuestos seleccionados para pruebas adicionales deben tener cierto parecido estructural con los ligandos conocidos; es decir, tener una cabeza polar y una cola hidrofóbica, así como cierta flexibilidad conformacional. En base a esto, seleccionamos un grupo de 147 compuestos que incluyen chalconas, acetogeninas, protoberberinas, nitrosopirimidinas, benzodiacepinas y carbamatos, entre otros. Las "huellas dactilares" de estos 147 compuestos se calcularon utilizando Open Babel[21], un sistema experto químico utilizado principalmente para convertir formatos de archivo químico, y los resultados se compararon con las "huellas dactilares" obtenidas para los 54 compuestos utilizados anteriormente para probar el modelo. Aquellos compuestos que tienen un índice de Tanimoto (Tc)[16] mayor que 0,7 fueron descartados. Tenga en cuenta que las así llamadas "huellas dactilares" son una forma de codificar la estructura de una molécula para compararla con otros compuestos; mientras que el Tc es una medida de la similitud entre dos estructuras que van de 0 a 1. Sobre la base del índice Tc, seleccionamos 114 compuestos estructuralmente diferentes que poseen diferencias estructurales con respecto a los ligandos conocidos del conjunto de prueba, lo que justifica su posterior estudio.

4.3. Síntesis química

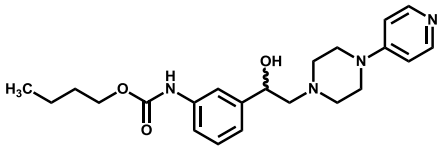
El modelo obtenido predijo dieciséis compuestos diferentes como potenciales inhibidores de SphK1 (Tabla 1) que se probaron en ensayos *in vitro* para la inhibición de SphK1 recombinante. La síntesis de los compuestos **2-12**, **14** y **15** se ha reportado en una publicación en una revista científica durante la realización de este Trabajo de Tesis Doctoral[22], y aquí se describe su caracterización junto con los compuestos **7-9** que se informaron solo como agentes antimicrobianos y/o antioxidantes moderados, pero sin su síntesis y datos analíticos[23–25]. La síntesis y caracterización de los compuestos **1**, **13** y **16** han sido reportadas previamente[26–28].

El compuesto **2** se sintetizó en dos pasos a partir de 4-cloro-6,11-dimetil-6,11-dihidro-5*H*-benzo[*b*]pirimido[5,4-*f*]azepina sintéticamente disponible[26] por tratamiento con exceso de monohidrato de hidrazina y la posterior condensación del derivado hidrazinilo resultante con *p*-clorobenzaldehído. Tanto el precursor anterior del compuesto **1** como el compuesto **2** se prepararon siguiendo el procedimiento general mostrado en el Esquema 1, que parte de la 5-alil-4,6-dicloropirimidina correspondiente que sufre una aminólisis por reacción con una metilanilina *N*-sustituida para proporcionar la correspondiente 5-alil-4-arilamino-4-cloropirimidina que bajo un medio ácido fuerte provoca la ciclación intramolecular de Friedel-Crafts para proporcionar la 6,11-dihidro-5*H*-benzo[*b*]pirimido[5,4-*f*]azepina correspondiente; en el caso de *p*-metoxi-N-metilanilina, se observa la desmetilación del grupo metoxi en la etapa de ciclación y, por lo tanto, se obtiene el compuesto **1**.

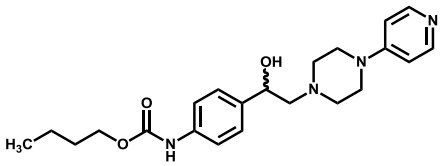
Tabla 1. Características estructurales de los compuestos evaluados como inhibidores de SphK1

Comp.	Estructura	Comp.	Estructura
1		**9**	
2		**10**	

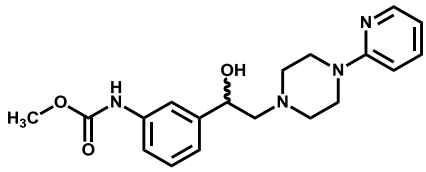
3



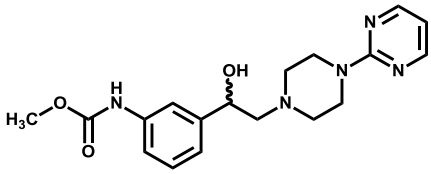
4



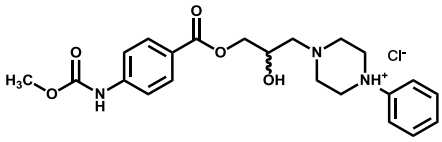
5



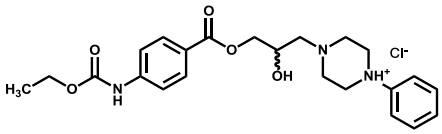
6



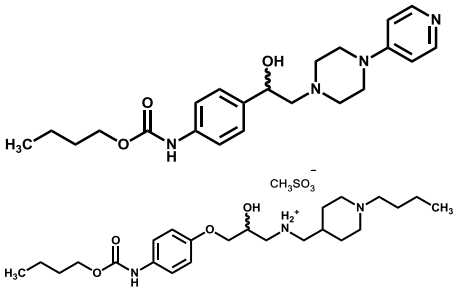
7



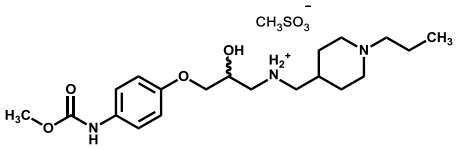
8



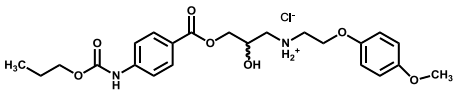
11



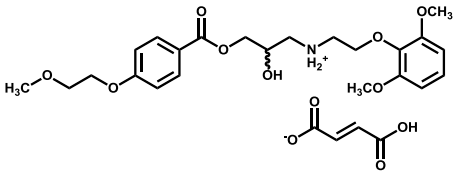
12



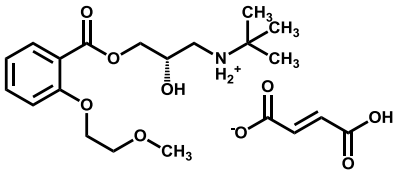
13



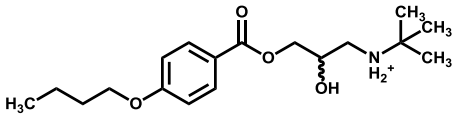
14



15

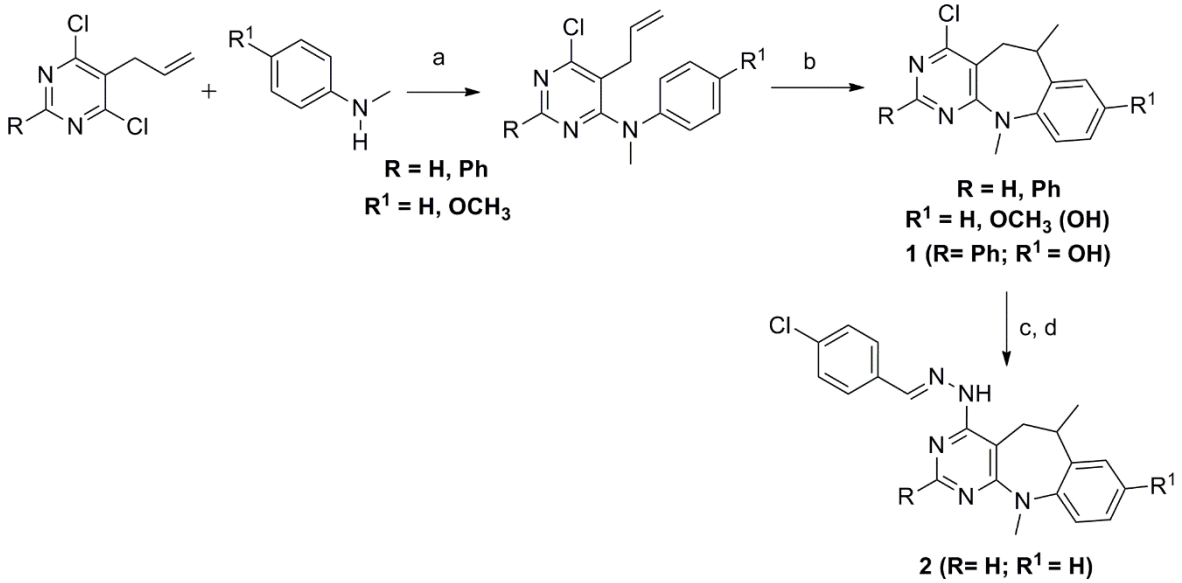


16

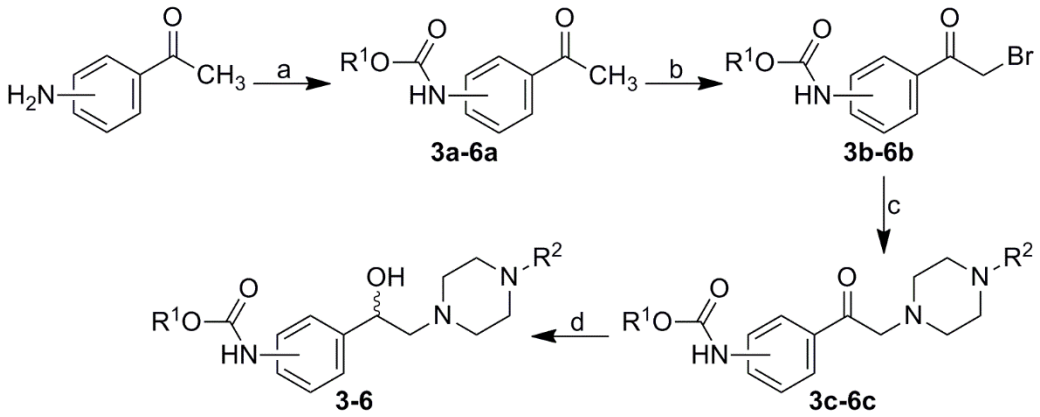


La reacción de 3- o 4-aminoacetofenona con el alquilcloroformiato adecuado proporcionó el alquil(3-/4-acetilfenil)carbamato (**3a-6a**) correspondiente, que reaccionó con bromo en cloroformo para producir alquil[3-/4-(bromoacetil)fenil]carbamato (**3b-6b**); estos compuestos por tratamiento con diferentes aril(heteroaril)piperazinas N-monosustituidas proporcionaron los alquil{3-/4-[(4-aril(heteroaril)piperazin-1-il)acetil]fenil}carbamato (**3c-6c**). La posterior reducción del grupo ceto

usando $NaBH_4$ proporcionó alquil[{3-/4-[1-hidroxi-2-(4-aril(heteroaril)piperazin-1-il)etil]fenil}carbamato (**3-6**), véase el Esquema 2.



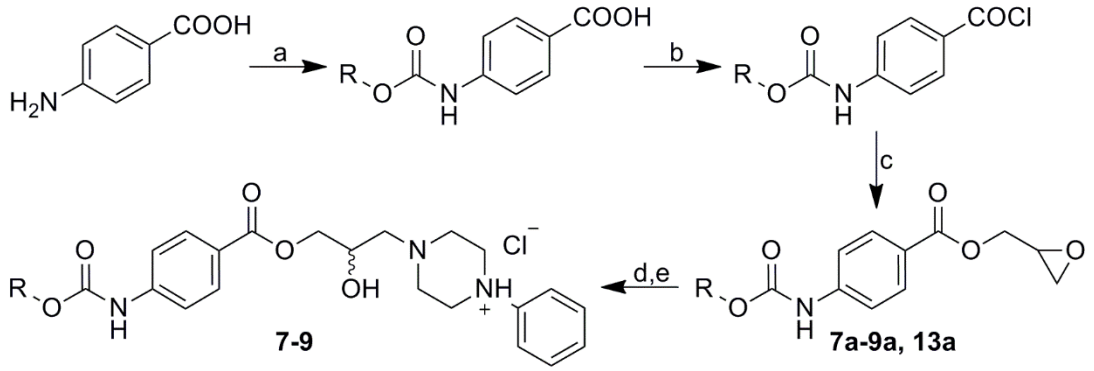
Esquema 1. Síntesis de 4-cloro-6,11-dimetil-6,11-dihidro-8-hidroxi-2-fenil-5*H*-benzo[*b*]pirimido[5,4-f]azepina, (**1**) (R = Ph; R^1 = OH) y (*E*)-4-(2-(4-clorobenziliden)hidrazinil)-6,11-dimetil-6,11-dihidro-5*H*-benzo[*b*]pirimido[5,4-f]azepina (**2**) (R = R^1 = H). *Reactivos y condiciones*: a) DIPEA, EtOH, reflujo, 48-72 hs.; b) CH_3SO_3H, 115-120 °C, 10-20 min; c) $NH_2NH_2{\cdot}H2O$, EtOH, reflujo, 24 hs.; d) *p*-clorobenzaldehído, EtOH, AcOH (cat.), 4 hs., reflujo.



Esquema 2. Síntesis de alquil{3-/4-[1-hidroxi-2-(4-arilpiperazin-1-il)etil]fenil}carbamatos (**3-6**). R^1: 3-Me, 3-Bu, 4-Bu; R^2: piridina-2-il, piridina-4-il, pirimidina-2-il. *Reactivos y condiciones*: a) $ClCOOR^1$, piridina, acetona, reflujo 3 hs.; b) Br_2, $CHCl_3$, temperatura ambiente 3 hs.; c) *N*-(hetero)arilpiperazina, TEA, THF, temperatura ambiente 3 hs.; d) $NaBH_4$, MeOH, reflujo 3 hs.

Los cloruros de 1-(3-{4-[(alcoxicarbonil)amino]benzoiloxi}-2-hidroxipropil)-4-fenilpiperazin-1-io (**7-9**) estudiados fueron preparados mediante la reacción de múltiples etapas descripta en el Esquema 3. Los epóxidos **7a-9a** y **13a** (véase a continuación) se prepararon a partir de ácido 4-aminobenzoico por reacción con cloroformiatos de metilo, etilo, propilo y butilo dando lo ácidos 4-[(alcoxicarbonil)amino]benzoicos

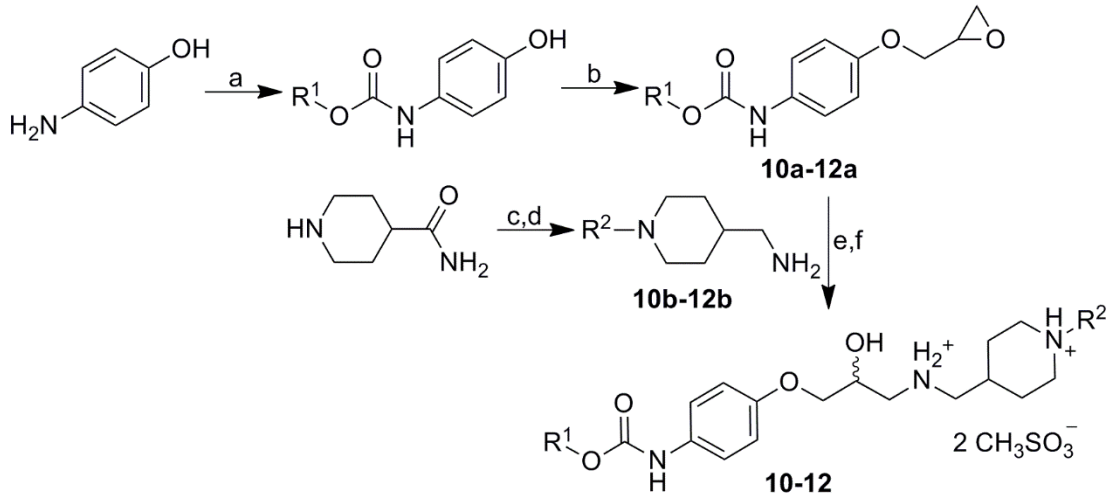
respectivos. Los cloruros de estos ácidos formados por el tratamiento con cloruro de tionilo dieron los epóxidos deseados **7a-9a** y **13a** después de la reacción con 2,3-epoxipropan-1-ol[28]. En la última etapa, los compuestos finales **7-9** se prepararon mediante una reacción de los epóxidos con 1-(4-fenil)piperazina y luego se convirtieron en las sales de hidrocloruro usando HCl etéreo para mejorar su solubilidad en agua[29].



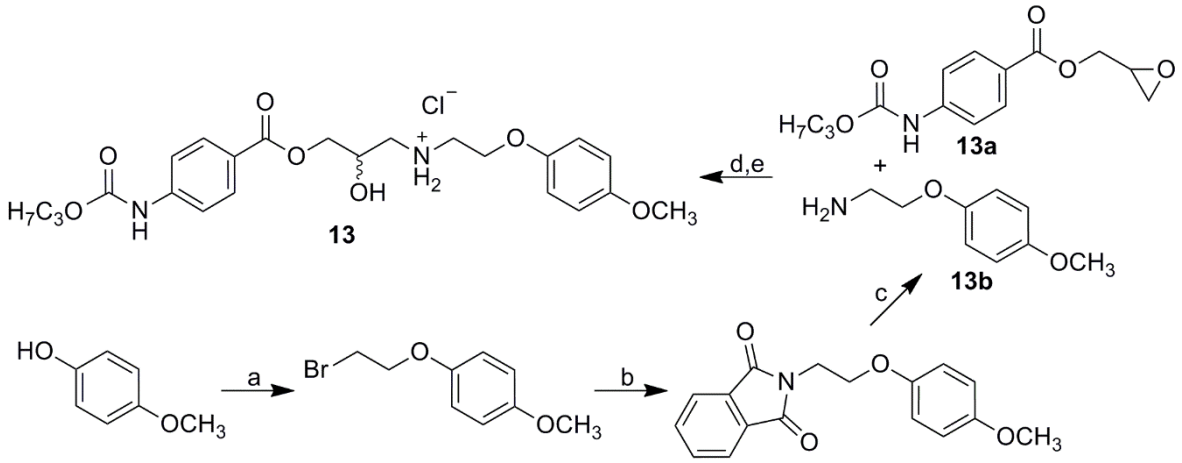
Esquema 3. Síntesis cloruros de 1-(3-{4-[(alcoxicarbonil)amino]benzoiloxi}-2-hidroxipropil)-4-fenilpiperazin-1-io (**7-9**). R: Me, Et, Bu y Pr (**13a**). *Reactivos y condiciones*: a) ClCOOR, piridina, acetona, reflujo 3 hs.; b) $SOCl_2$, tolueno, reflujo; c) 2,3-epoxipropan-1-ol, THF, TEA, 0°C y luego temperatura ambiente; d) 1-fenilpiperazina, *i*-PrOH, reflujo; e) HCl, Et_2O, temperatura ambiente.

(1-butilpiperidin-4-il)metanamina (**10b** = **11b**) y (1-propilpiperidin-4-il) metanamina (**12b**) se prepararon de acuerdo con la reacción de piperidina-4-carboxamida por alquilación seguida de reducción[30,31]. La preparación de los productos **10-12** se realizó de la siguiente manera: el 4-aminofenol comercialmente disponible se trató con cloroformiatos de alquilo (R^1 = Me, Bu) seguido de la adición de epiclorohidrina para dar el [4-(oxiran-2-ilmetoxi)fenil]carbamato de metilo (**10a** = **12a**) y [4-(oxiran-2-ilmetoxi)fenil]carbamato de butilo (**11a**)[32]. Los carbamatos se acoplaron luego a metanaminas previamente preparadas en metanol a temperatura ambiente. Los productos finales preparados como bases libres se transformaron para convertirse en dimetanosulfonatos de 4-{[(2-hidroxi-3-{4-[(alcoxicarbonil)amino]fenoxi}propil)azanioil]metil}-1-alquilpiperidin-1-io **10-12**, ver Esquema 4.

La síntesis del hidrocloruro de 2-hidroxi-3-[2-(4-metoxifenoxi)etilamino]propil-4-(propoxicarbonilamino)benzoato (**13**) se describió en Tengler et al.[28]. El primer intermediario importante, oxiran-2-ilmetil 4-(propoxicarbonil)amino]benzoato (**13a**) se sintetizó de acuerdo con el Esquema 3. El anillo epóxido se abrió mediante la adición del segundo intermediario principal, 2-(4-metoxifenoxi)etanamina (**13b**) preparado por síntesis de Gabriel a partir de 4-metoxifenol empleando de 1-(2-bromoetoxi) -4-metoxibenceno y 2-[2-(4-metoxifenoxi)etil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona, véase Esquema 5. La sal de hidrocloruro soluble en agua se preparó a partir de la base adquirida usando HCl etéreo, como se describe en Tengler et al.[28].



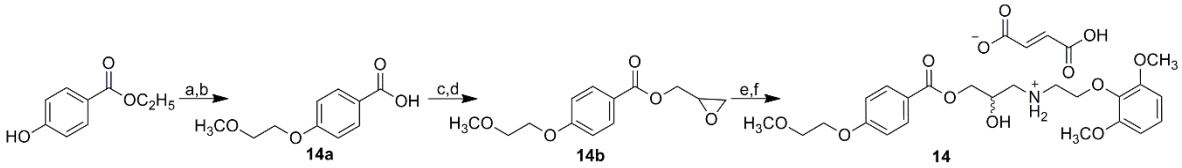
Esquema 4. Síntesis de alquil [4-(3-{[(1-alquilpiperidin-4-il)metil]amino}-2-hidroxipropoxi)fenil]carbamato dimetanosulfonatos (**10-12**). R^1: Me, Bu; R^2: Pr, Bu. *Reactivos y condiciones*: a) $ClCOOR^1$, Et_2O, piridina, temperatura ambiente; b) 2-(clorometil)oxirano, Et_2O, KOH, temperatura ambiente; c) haluros de alquilo; d) $LiAlH_4$; e) MeOH, temperatura ambiente; f) CH_3SO_3H, acetona.



Esquema 5. Síntesis de hidrocloruro de 2-hidroxi-3-[2-(4-metoxifenoxi)etilamino]propil 4-(propoxicarbonilamino) benzoato (**13**). *Reactivos y condiciones*: **13a** ver Esquema 3; a) 1,2-dibromoetano, NaOH; b) ftalimida de potasio, KI, DMF; c) $NH_2NH_2{\cdot}H2O$, EtOH; d) *i*-PrOH; e) HCl, Et_2O.

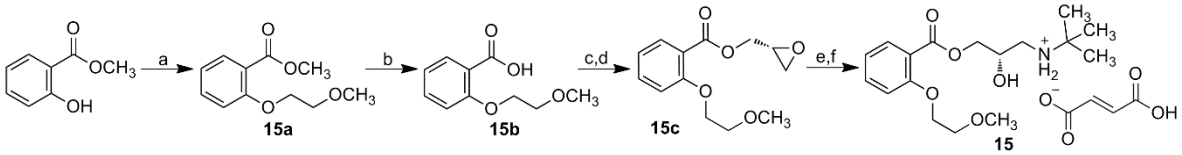
El producto final **14** se preparó mediante síntesis en múltiples pasos como se describe en el Esquema 6. Los tosilato intermediarios 2-metoxietil-4-metilbencenosulfonato y oxiran-2-ilmetil-4-metilbencenosulfonato se prepararon de acuerdo con el procedimiento publicado por reacción de cloruro de 4-metilbencenosulfonilo con 2-metoxietanol y oxiran-2-ilmetanol, respectivamente, en diclorometano[33,34]. La 2-(2,6-dimetoxifenoxi) etanamina se preparó mediante síntesis de Gabriel (véase el Esquema 5) a partir de 2-[2-(2,6-dimetoxifenoxi)etil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona en dos pasos de síntesis a partir de 2,6-dimetoxifenol que dio 2-(2-bromoetoxi)-1,3-dimetoxibenceno con 1,2-

dibromoetano. Luego, el 2-(2-bromoetoxi)-1,3-dimetoxibenceno se hizo reaccionar con ftalimida de potasio[35]. La síntesis principal se llevó a cabo según lo descripto por Marvanova et al.[36]. El ácido 4-(2-metoxi)etoxibenzoico (**14a**) se preparó a partir de 4-hidroxibenzoato de etilo por reacción con 4-metilbencenosulfonato de 2-metoxietilo y después se realizó la hidrólisis del éster. El producto final, sal de fumarato (**14**), se preparó a partir de la sal de potasio del ácido **14a** que dio 4-(2-metoxietoxi)benzoato de (oxiran-2-il)metil (**14b**) después de la reacción con oxiran-2-ilmetilo 4-metilbencenosulfonato. El anillo de oxirano fue luego abierto por 2-(2,6-dimetoxifenoxi)etanamina. La base obtenida se convirtió finalmente en su sal de fumarato usando una solución etérea de ácido fumárico para mejorar la solubilidad de los compuestos en agua.



Esquema 6. Síntesis del fumarato de [2-(2,6-dimetoxifenoxi)etil]{2-hidroxi-3-[4-(2-metoxietoxi)benzoiloxi]propil}amonio (**14**). *Reactivos y condiciones*: a) 4-metilbencenosulfonato de 2-metoxietilo, K_2CO_3, acetona, temperatura ambiente; b) i) NaOH, ii) HCl, $CHCl_3$; c) MeOH, *i*-PrOH, KOH; d) oxiran-2-ilmetil 4-metilbencenosulfonato, DMF, 7 hs., 70ºC; e) 2-(2,6-dimetoxifenoxi)etanamina, *i*-PrOH, 1 h. a 85 ° C y durante 72 hs. a temperatura ambiente; f) ácido fumárico, Et_2O.

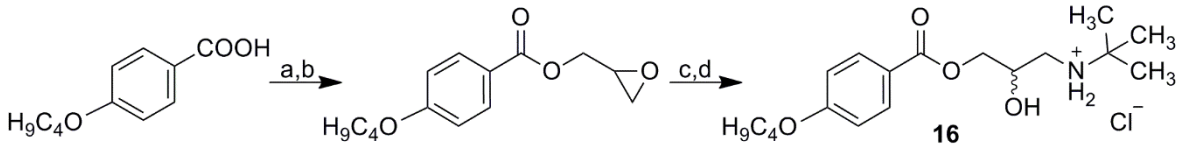
El 1-cloro-2-metoxietano por reacción con 2-hidroxibenzoato de metilo dio 2-(2-metoxietoxi)benzoato de metilo (**15a**) que produjo el ácido **15b** después de la hidrólisis. Una reacción del ácido con $SOCl_2$ proporcionó cloruro de 2-(2-metoxietoxi)benzoilo que con (2*S*)-oxiran-2-ilmetanol en presencia de 4-dimetilaminopiridina forma 2-(2-metoxietoxi)benzoato de (2*R*)-oxiran-2-ilmetilo (**15c**), el cual reacciona con *terc*-butilamina dando como resultado la formación de 2-(2-metoxietoxi)benzoato de (2*R*)-3-(*terc*-butilamino)-2-hidroxipropil que se convirtió en la sal de fumarato (**15**), ver Esquema 7.



Esquema 7. Síntesis del fumarato de [2-(2,6-dimetoxifenoxi)etil]{2-hidroxi-3-[4-(2-metoxietoxi)benzoiloxi]propil} amonio (**15**). *Reactivos y condiciones*: a) 1-cloro-2-metoxietano, K_2CO_3, KI, DMF, reflujo, 6 hs.; b) i) NaOH, ii) HCl, CH_3Cl; c) $SOCl_2$, tolueno; d) (2*S*)-oxiran-2-ilmetanol, DMAP, CH_2Cl_2; e) *terc*-butilamina, *i*-PrOH; f) ácido fumárico, Et_2O.

El compuesto objetivo **16** se preparó mediante una síntesis de etapas múltiples de acuerdo con el Esquema 8, como se describe en Tengler et al.[27]. El ácido 4-butoxibenzoico de partida se trató con ácido clorhídrico para formar un epóxido adecuado con 2,3-epoxipropan-1-ol. El epóxido se

abrió por reacción con *terc*-butilamina y dio 3-*terc*-butilamino-2-hidroxipropil 4-butoxibenzoato. La base obtenida se transformó en la sal de hidrocloruro (**16**) para obtener una mayor solubilidad en agua usando HCl etéreo[27].



Esquema 8. Síntesis de hidrocloruro de 3-*terc*-butilamino-2-hidroxipropil 4-butoxibenzoato (**16**). Reactivos y condiciones: a) tolueno, PCl_5; b) 2,3-epoxipropan-1-ol, CH_2Cl_2; c) *terc*-butilamina, *i*-PrOH; d) HCl, Et_2O

4.4. Afinidades de unión por SphK1 (Bioensayos)

Los posibles inhibidores de SphK1 se evaluaron en un formato de alto rendimiento de 384 pocillos como se describe en detalle en el capítulo de métodos de este Trabajo de Tesis Doctoral.

Si bien la mayoría de los 16 compuestos mostraron cierta actividad inhibitoria, solo 3 de ellos mostraron actividad significativa como inhibidores (Figura 8). De este modo, una dihidrobenzo[*b*]pirimido[5,4-*f*]azepina (**2**) y dos alquil {3-/4-[1-hidroxi-2-(4-arilpiperazin-1-il)etil]fenil}carbamatos (**3** y **4**) fueron los compuestos que poseen actividades inhibidoras significativas contra SphK1; el compuesto 2 tiene una actividad inhibidora relativamente fuerte con una IC_{50} de 12 μM. Si bien esta inhibición puede ser considerada moderada si se la compara con los compuestos actualmente en uso, resulta muy significativa para compuestos obtenidos mediante un cribado primario como resultado de una detección exploratoria.

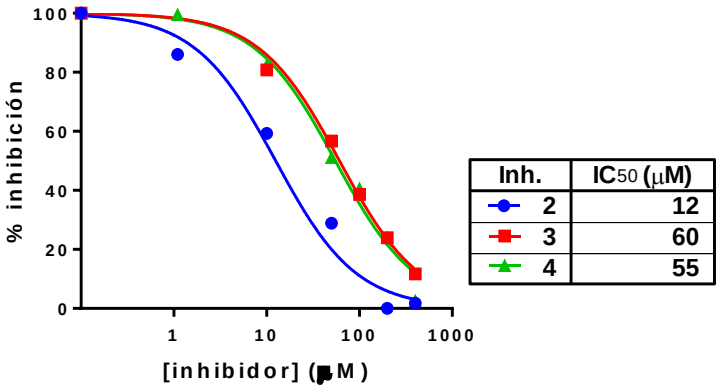


Fig. 8. Gráfico de porcentaje de inhibición de SphK1 *versus* la concentración de los compuestos **2**, **3** y **4**.

4.5. Modelado molecular

Con el fin de determinar por qué estos compuestos obtenidos mediante el cribado virtual eran inhibidores mucho más débiles que **PF-543**, uno de los inhibidores de SphK1 más potentes reportados hasta la fecha[7,9], se realizó un estudio de modelado molecular. El objetivo principal de este estudio fue evaluar las interacciones moleculares que pueden estabilizar y desestabilizar los diferentes complejos Ligando-Receptor (L-R). Se simularon las interacciones moleculares de los compuestos activos (**2**, **3** y **4**) con SphK1 para analizar las diferentes interacciones moleculares implicadas en los complejos de los nuevos compuestos con SphK1 y también se incluyó en el estudio el compuesto **PF-543**, lo cual permitió realizar un análisis comparativo de las diferentes actividades mostradas para estas moléculas en relación con sus diferencias estructurales.

El estudio de modelado molecular se realizó en tres etapas diferentes. En el primer paso, se llevó a cabo un estudio de cribado utilizando el programa de AutoDock[38]. En la segunda etapa de este estudio, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) utilizando el paquete de software AMBER14[39]. A partir de las trayectorias obtenidas, se elaboró un análisis de descomposición por residuo para los diferentes compuestos. Finalmente, para comprender mejor las interacciones moleculares involucradas en los diferentes complejos L-R, se llevó a cabo un estudio de Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) para las estructuras más representativas de cada complejo. En estudios previos se ha demostrado la importancia de los estudios QTAIM para comprender los detalles de las diferentes interacciones moleculares que estabilizan o desestabilizan diversos complejos[40–44].

A partir de los estudios de cribado (aunque podrían considerarse exploratorios y preliminares), ya era posible ver diferencias significativas entre **PF-543** y algunos de los nuevos compuestos. Para **PF-543**, los estudios de cribado sugieren que se une en el bolsillo en forma de J (cabeza polar en el zona polar del receptor y la cola hidrofóbica en las áreas hidrofóbicas) (Figura 9a). Se obtuvo el mismo resultado para el compuesto **2** (Figura 9b). Por el contrario, el análisis de docking de los compuestos **3** y **4** sugieren que estos compuestos se pueden unir de dos maneras: en la forma J conocida y en una forma invertida en la que la cabeza polar interactúa con la región hidrofóbica del receptor y la cola hidrofóbica se ubica en la región polar del bolsillo de unión (Figura 9c y d). Es interesante observar que el compuesto **2**, que posee el efecto inhibidor más fuerte entre los compuestos obtenidos aquí, se une al sitio activo solo en la denominada “forma correcta”, al igual que **PF-543**.

La Figura 9b muestra una superposición espacial de los compuestos **2** y **PF-543**. Esta figura muestra claramente que las porciones hidrófobas de ambos compuestos se superponen muy bien y encajan perfectamente

en la parte hidrófoba del sitio activo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el compuesto **2** es más corto que **PF-543** y, por lo tanto, no puede interactuar con D178 (la distancia interatómica entre la cabeza polar del compuesto **2** y D178 es de aproximadamente 8 Å).

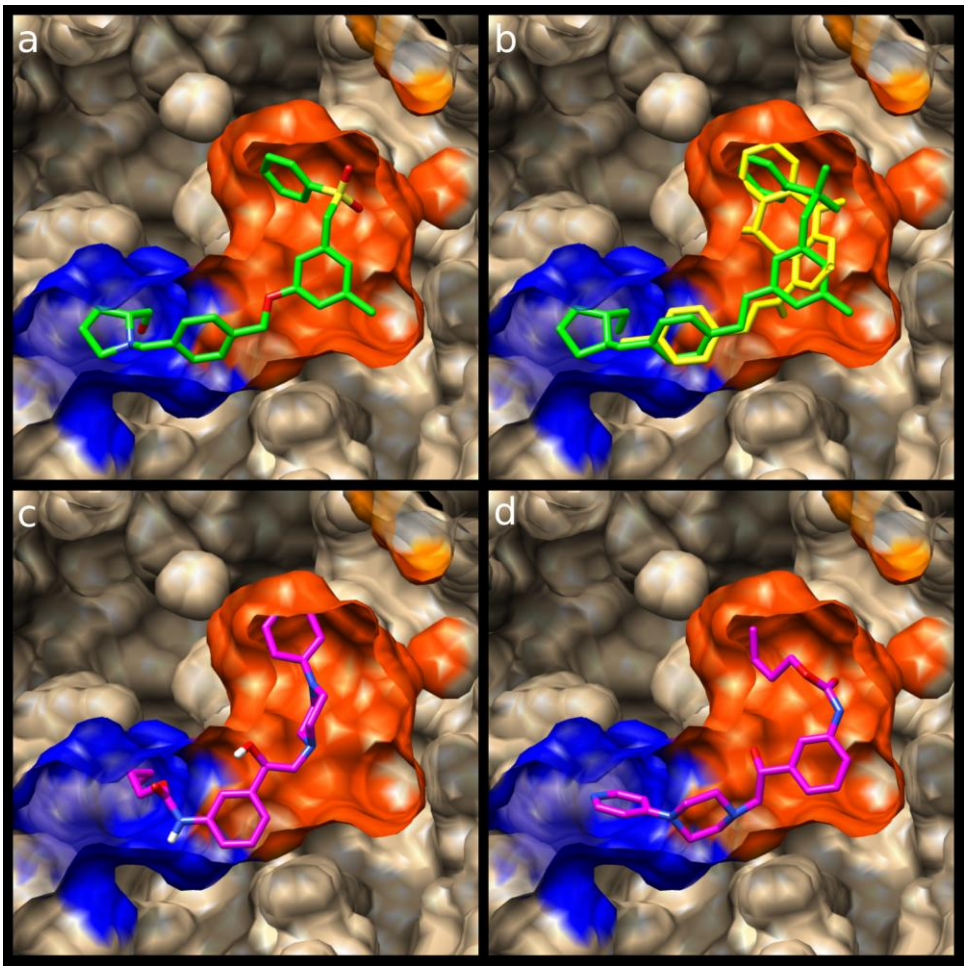


Fig. 9. Vista espacial de los diferentes ligandos unidos en el bolsillo de unión de SphK1. Las zonas azul y naranja representan las porciones catiónica e hidrofóbica del sitio activo, respectivamente. **(a) PF-543** (en verde), **(b) PF-543** (en verde) superpuesto sobre el compuesto **2** (en amarillo). **(c)** y **(d)** el compuesto **3** (en magenta) se muestra unido de las dos maneras diferentes.

También se obtuvieron resultados interesantes de las simulaciones de dinámica molecular. El análisis por residuo obtenido a partir de tales simulaciones permitió definir las principales interacciones que estabilizan los diferentes complejos (Figura 10). En general, los compuestos activos estudiados aquí mostraron sus porciones farmacofóricas en una forma espacial muy similar a la mostrada por **PF-543**[9] y otros inhibidores conocidos de SphK1[1,14]. Consistente con los resultados experimentales anteriores[13,45,46], las simulaciones indican la importancia de D178 cargado negativamente, y de los residuos F192, L268 y F303 para la unión de estos ligandos a SphK1 (Figura 10). La superposición de interacciones para los compuestos **2**, **3** y **4** con los encontrados para **PF-543** se exponen en la

Figura 10a-c. A partir de esto, es evidente que estos compuestos se unen de manera similar a **PF-543** porque interactúan esencialmente con los mismos aminoácidos. Sin embargo, estas interacciones son generalmente más débiles que las mostradas para **PF-543** a lo largo de las simulaciones. Estos resultados están de acuerdo con los datos experimentales y podrían explicar, al menos en parte, los menores efectos inhibidores de los compuestos **2**, **3** y **4** si se los compara a **PF-543**.

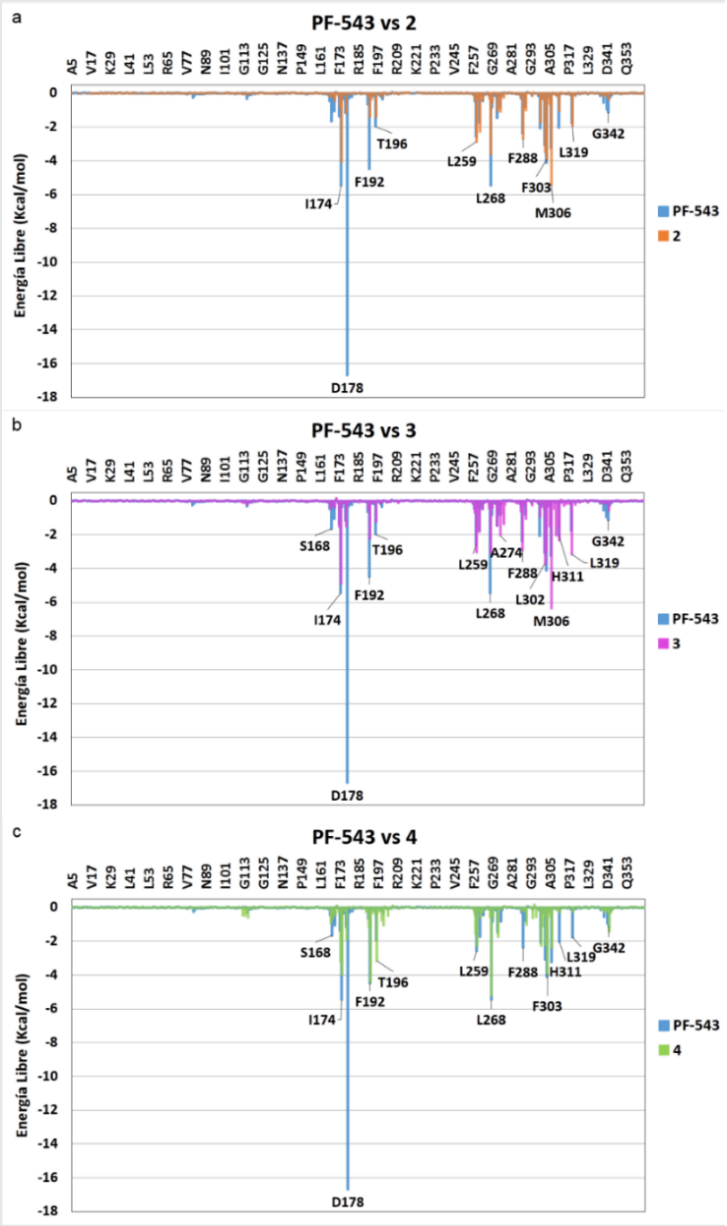


Fig. 10. Histogramas superpuestos que muestran las energías de interacción de los compuestos **2** (naranja), **3** (violeta) y **4** (verde) con los principales aminoácidos implicados en la formación del complejo. El histograma obtenido para **PF-543** se muestra en azul claro para comparar.

Es importante señalar que este estudio se focalizó particularmente en detectar y cuantificar las interacciones que estabilizan y desestabilizan la formación de los complejos de los inhibidores con SphK1. Si bien estas interacciones son en su mayoría relativamente débiles, está claro que las

simulaciones de dinámica molecular no son lo suficientemente precisas como para compararlas con las afinidades observadas experimentalmente.

Por lo tanto, se decidió realizar un estudio QTAIM que pueda cuantificar mejor las interacciones moleculares obtenidas para los diferentes complejos. Recientemente se informó en bibliografía que el valor de la densidad de carga en el punto crítico del enlace (ρ(r)), que es un descriptor de la fuerza de los diferentes enlaces, puede usarse para cuantificar la afinidad de un ligando para formar un complejo ligando-receptor[41,44]. Se analizaron los complejos obtenidos para los compuestos **2**, **3** y **4** usando este tipo de análisis y también incluimos el compuesto **PF-543** para establecer una comparación.

La Figura 11 muestra la suma de los valores de ρ(r) correspondientes a las interacciones de la cabeza polar (barras azules) y la cola hidrofóbica (barras naranja) obtenidas para los compuestos **PF-543**, **2**, **3** y **4**. La suma de los valores de ρ(r) para todas las interacciones de una parte del inhibidor (es decir, la cabeza polar o cola hidrofóbica) proporciona una medida de la fuerza de anclaje de cada átomo del inhibidor al bolsillo de unión. Esto muestra claramente que la cola hidrófoba de los compuestos **2**, **3** y **4** se une a SphK1 con una menor firmeza a la observada para **PF-543**, siendo el compuesto **2** el mejor de los tres compuestos, estando de acuerdo con datos experimentales. Por otra parte, el anclaje a través de la cabeza polar es mucho más débil para los nuevos inhibidores que para el **PF-543**, que está más fuertemente anclado en el bolsillo de unión (Figura 11). Los compuestos **3** y **4** poseen mayores interacciones con esta parte del bolsillo de unión según este análisis, pero hay que tener en cuenta que solo se analizan las conformaciones en una sola posición, y como se explicó en el apartado anterior, estos compuestos pueden posicionarse de dos maneras diferentes según los resultados obtenidos mediante las técnicas de docking (Figura 9).

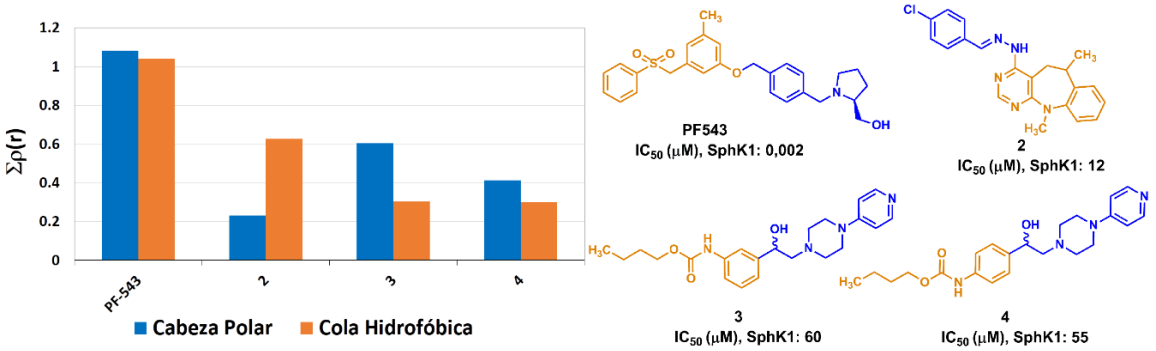


Fig. 11. Valores de densidad de carga para las interacciones totales de la cabeza polar (barras azules) y la cola hidrofóbica (barras naranja) para **PF-543** y los compuesto **2**, **3** y **4** en el bolsillo de unión. En la parte derecha de gráfico, se muestran las estructuras de los compuestos con los átomos coloreados en azul y naranja que corresponden a la zona considerada como la cabeza polar y cola hidrofóbica, respectivamente. Los contactos repulsivos cortos C-H···H-C no fueron incluidos.

La fuerza y la debilidad de las diferentes interacciones moleculares podrían apreciarse mejor en la Figura 12, que muestra un análisis comparativo de las diferentes interacciones por residuo. Cabe señalar que la interacción más fuerte para **PF-543** es con D178 (indicado por una flecha roja). Parece que este ácido aspártico altamente conservado es importante para la unión de los ligandos, lo que indica que el grupo carboxilo terminal puede funcionar como un punto de anclaje para las moléculas que poseen una fuerte actividad inhibidora contra SphK1[14,45,46]. Después de 1,5 ns de simulaciones de dinámica molecular, el ligando se mueve un poco en comparación con su posición inicial; sin embargo, la fuerte interacción con D178 se mantiene, lo que apoya la sugerencia de que este residuo podría funcionar como un punto de anclaje para este tipo de ligandos. Esta interacción no está presente en el compuesto **2** y **3**. En el compuesto **4** se encuentra débilmente formada pero carece de las mayorías de las interacciones importantes en la zona β11-α9. Todas estas insuficiencias a nivel de interacciones dan a lugar a la disminución de la capacidad inhibitoria de estos nuevos compuestos. Por lo tanto, a partir de estos resultados, la introducción de cambios estructurales para mejorar esta interacción podría conducir a inhibidores más activos.

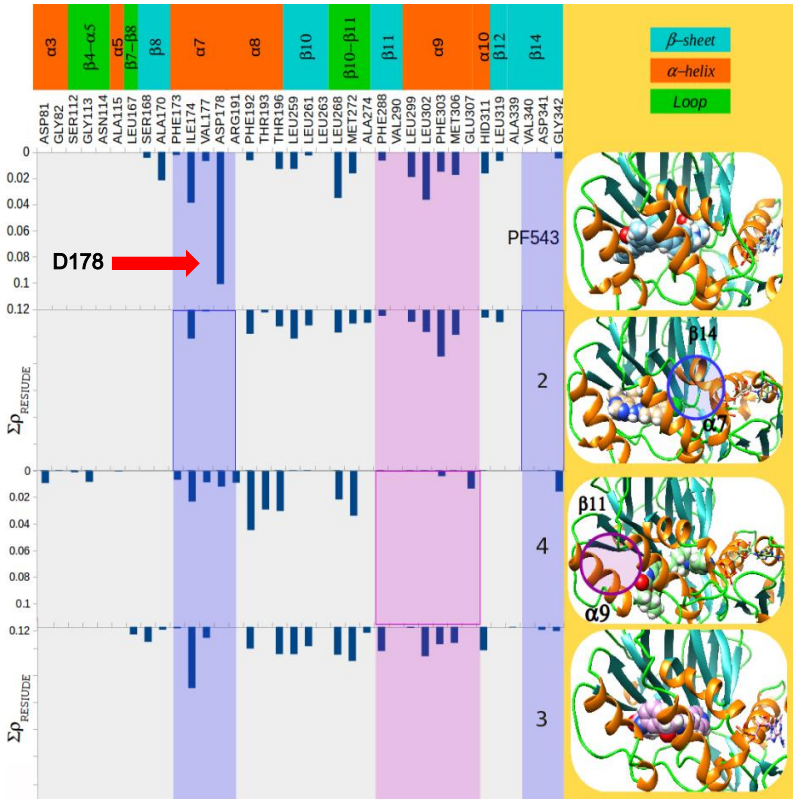


Fig. 12. Valores de densidad de carga obtenidos para las interacciones totales de **PF-543** y los compuestos **2**, **3** y **4** con los diferentes aminoácidos con que interactúan. La fuerte interacción de **PF-543** con D178 se denota con una flecha roja. Esta interacción está ausente en el compuesto **2**. En el compuesto **2** y **4** se resalta con un circulo azul y violeta, respectivamente, las zonas de la proteína ausentes de interacciones estabilizantes.

Se evaluaron las diferentes interacciones moleculares obtenidas en detalle para los complejos usando gráficos moleculares (Figura 13). El tamaño molecular de estos complejos es grande y, por lo tanto, no es posible visualizar en detalle las diferentes interacciones que estabilizan y desestabilizan dichos complejos y se focalizó particularmente en las diferentes interacciones moleculares que tienen lugar en la cabeza catiónica de los ligandos. Debe señalarse que las interacciones moleculares observadas en las colas hidrofóbicas de todos los ligandos son muy similares en todos los complejos estudiados aquí.

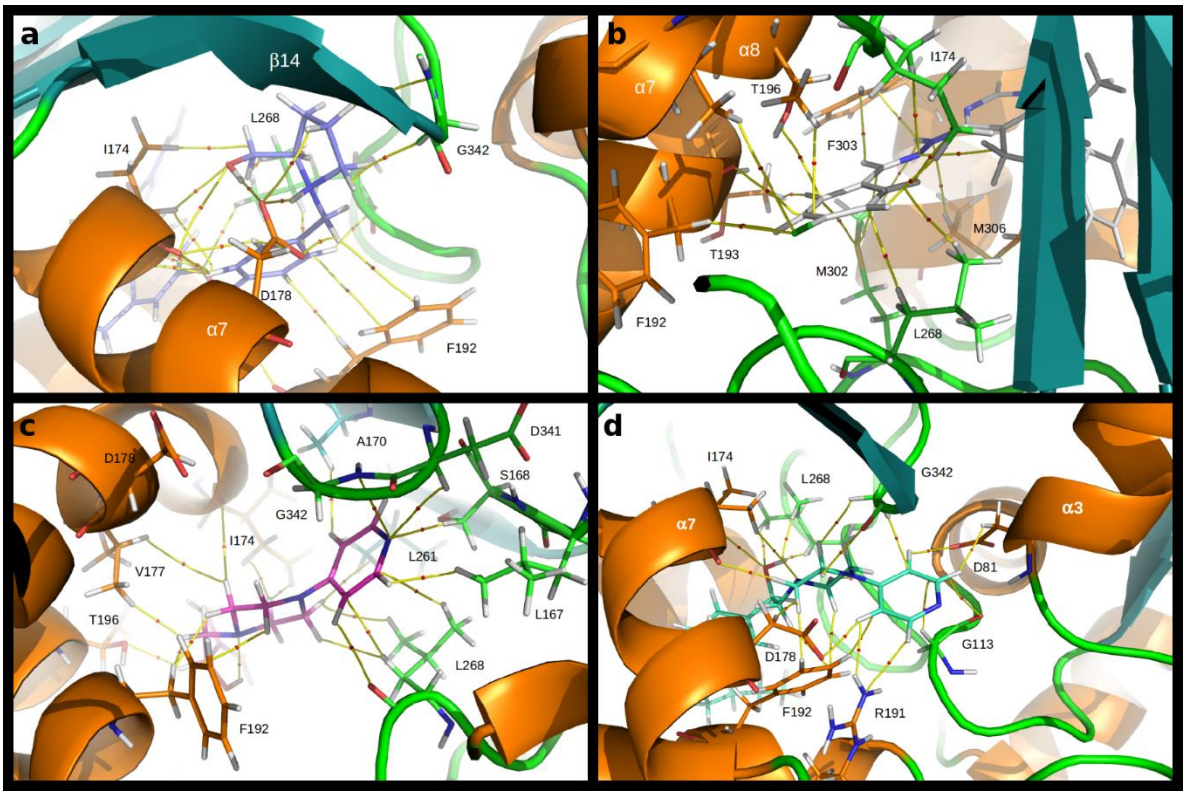


Fig. 13. Gráfica molecular de la densidad de carga obtenida para el complejo de SphK1 con **(a) PF-543** (violeta), **(b)** compuesto **2** (gris), **(c)** compuesto **3** (magenta) y **(d)** compuesto **4** (cian). Las líneas amarillas que conectan los núcleos son las rutas de enlace, y las pequeñas esferas rojas sobre ellas son los puntos críticos de enlace (BCP).

La Figura 13a muestra las interacciones principales: I174, D178, F192, L268 y G342, que estabilizan la cabeza polar de **PF-543** complejado con SphK1. Un punto crítico de enlace (BCP por sus siglas en inglés, Bond Critical Point) y las rutas de enlace correspondientes que conectan el grupo amino protonado de **PF-543** con el grupo carboxilato de D178 se pueden observar en el gráfico molecular de la Figura 13a. El valor de densidad de carga local ($\rho(r)$) en este BCP es 0,0415 u.a. que está en el límite entre un puente de hidrógeno moderado a fuerte[47]. El **PF-543** también está interaccionando con D178 a través de otro puente de hidrógeno moderado O-H···O=CO ($\rho(r)$ = 0,0365 u.a.) y dos contactos C-H···O=CO débiles ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0129 u.a.). Además, **PF-543** también forma

varias interacciones intermoleculares con I174, la mayoría de ellas involucran el alcohol primario del inhibidor. En conjunto, las interacciones con I174 contribuyen en 0,03880 u.a. de densidad de carga para el anclaje de **PF-543** en la cavidad de la enzima. El residuo A170 en la pared posterior de la cavidad en forma de J también contribuye apreciablemente ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0217 a.u.) al anclaje de **PF-543** en el bolsillo de unión (véase la Figura 12). El anillo bencénico de F192 forma interacciones del tipo π-stacking con el anillo aromático de la cabeza polar de **PF-543**. Si bien estas interacciones juntas solo contribuyen al anclaje de **PF-543** con la fuerza de un enlace de hidrógeno débil ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0064 u.a.), parecen ser críticas para el posicionamiento adecuado del inhibidor en la cavidad de la enzima.

La Figura 13b muestra las interacciones más relevantes observadas para el compuesto **2**. Se debe tener en cuenta que este compuesto tiene menos interacciones y más débiles que las del **PF-543**. A diferencia de **PF-543**, el compuesto **2** no forma ninguna interacción con D178. Además, el compuesto **2** virtualmente no forma interacciones con los residuos de la hélice α7 y de la lámina β14 que conforman las paredes frontal y posterior de la entrada a la cavidad SphK1, respectivamente. Esto se debe a que la parte polar del compuesto **2** no es lo suficientemente grande y por lo tanto el anclaje es impulsado por su cola hidrofóbica que tiende a ocupar la parte posterior de la cavidad en forma de J. Esto se resalta en recuadro a la derecha del perfil de descomposición para este compuesto que se muestra en la Figura 12. La cabeza polar del compuesto **2** está anclado en la cavidad de la enzima principalmente debido a interacciones con residuos de la hélice α8 (F192, T193, T196) y α9 (L268, M302, F306), que están a medio camino entre la entrada y la parte inferior de la cavidad en forma de J.

El compuesto **3** muestra una potencia de inhibición similar al compuesto **4** (55 μM). Sin embargo, no hay una relación directa entre la fuerza de unión estimada de estos compuestos y su capacidad para inhibir la función de la enzima. Al observar los perfiles de interacción en la Figura 12 puede verse que ambos compuestos muestran perfiles de interacción diferentes especialmente en la zona de β11-α7, donde **4** carece prácticamente de interacciones estabilizantes. Esto podría explicar por qué estos compuestos tienen valores de IC_{50} más bajos en comparación con los compuestos **2** y **PF-543** que se unen a SphK1 en un modo de unión similar.

La única diferencia estructural entre los compuestos **3** y **4** está en las posiciones de sustitución alrededor de sus anillos de benceno. Mientras que en el primero las dos ramas están en posición para, en el compuesto **3** las mismas ramificaciones están en posición meta entre sí, permitiendo que el último compuesto adopte una estructura más curva que puede coincidir con la forma de la cavidad.

Por otro lado, el compuesto **4** carece de las interacciones con los residuos de la hélice α9 y de la lámina β11 que conforman las paredes frontal y posterior del fondo de la cavidad SphK1, respectivamente. Debido a la topología inherente del compuesto **4**, la conformación curva que debe adoptar para coincidir con la forma de la cavidad en forma de J impondría una gran tensión en su estructura y por lo tanto adopta un modo de unión diferente en el que la cola hidrofóbica está anclada en un bolsillo diferente conformado por residuos de la hélice α9 y el bucle entre las láminas β10 y β11.

Del análisis anterior al menos podemos concluir que: a) se requiere la presencia de un puente salino entre el inhibidor y D178 para una potente inhibición enzimática y b) los inhibidores que se unen a SphK1 en el modo característico de forma J muestran mayores potencias de inhibición que los inhibidores que no.

En resumen, el estudio de modelado molecular indica claramente que **PF-543** proporciona interacciones moleculares más fuertes con SphK1 que los nuevos compuestos informados. Estos resultados están en completo acuerdo con los datos experimentales y podrían explicar al menos parcialmente los efectos inhibitorios significativamente menores observados para estos compuestos.

4.6. Conclusiones

Este estudio teórico y experimental ha permitido encontrar dos nuevos andamiajes estructurales (tres nuevos compuestos), que podrían utilizarse como estructuras de partida para el diseño y posterior desarrollo de nuevos inhibidores de SphK1. Dicho estudio se llevó a cabo en varios pasos: cribado virtual, síntesis, bioensayos y modelado molecular y ha permitido proponer el compuesto **2** como una excelente estructura de partida para el desarrollo de nuevos inhibidores de SphK1. El compuesto dihidrobenzo[*b*]pirimido[5,4-*f*]azepina representa un nuevo núcleo para inhibidores de SphK1 y debería encontrar aplicación al diseño y desarrollo de nuevos inhibidores de esta enzima.

Por otro lado, aunque los compuestos **3** y **4** mostraron menos actividad como inhibidores, teniendo en cuenta que se obtuvieron a partir de un cribado primario, estos compuestos son prometedores y también merecen un análisis adicional como estructuras iniciales alternativas. Otra contribución interesante es la comprensión de los detalles de ciertos aspectos estructurales que son esenciales para comprender la formación de las complejas interacciones ligando-SphK1.

Sobre la base de los resultados de modelado molecular, se considera que a partir de los resultados ya obtenidos en los primeros pasos, es posible obtener información útil y una clara orientación para el diseño de

nuevos inhibidores. Parece que aquellas estructuras, en las que es posible distinguir más claramente la porción correspondiente a la cabeza catiónica y la cola hidrófoba, tienen más probabilidades de ser buenos ligandos para el sitio activo de la SphK1. Es importante señalar que dicha información no se puede obtener utilizando métodos muy simples como las técnicas de docking, por ejemplo. Para obtener información más detallada sobre estos complejos moleculares, es necesario utilizar técnicas más específicas. Por lo tanto, el uso de cálculos QTAIM permitió describir las interacciones moleculares que estabilizan los diferentes complejos L-R y sacar conclusiones con respecto a dos aspectos; por un lado, explicar por qué estos nuevos compuestos son significativamente menos potentes inhibidores de SphK1 que **PF-543**, y por otro lado determinar qué parte de los compuestos debe cambiarse para aumentar su afinidad con SphK1. De estos resultados, está claro que tanto el grupo en la porción correspondiente a la cabeza catiónica y a la cola hidrofóbica en menor medida, deben mejorarse para obtener un aumento en la unión de estos ligandos.

4.7. Referencias

(1) Gustin, D. J.; Li, Y.; Brown, M. L.; Min, X.; Schmitt, M. J.; Wanska, M.; Wang, X.; Connors, R.; Johnstone, S.; Cardozo, M.; et al. Structure Guided Design of a Series of Sphingosine Kinase (SphK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4608–4616.

(2) Paugh, S. W.; Paugh, B. S.; Rahmani, M.; Kapitonov, D.; Almenara, J. A.; Kordula, T.; Milstien, S.; Adams, J. K.; Zipkin, R. E.; Grant, S.; et al. A Selective Sphingosine Kinase 1 Inhibitor Integrates Multiple Molecular Therapeutic Targets in Human Leukemia. *Blood* **2008**, *112* (4), 1382–1391.

(3) French, K. J.; Schrecengost, R. S.; Lee, B. D.; Zhuang, Y.; Smith, S. N.; Eberly, J. L.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5962–5969.

(4) Mathews, T. P.; Kennedy, A. J.; Kharel, Y.; Kennedy, P. C.; Nicoara, O.; Sunkara, M.; Morris, A. J.; Wamhoff, B. R.; Lynch, K. R.; MacDonald, T. L. Discovery, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationship of Amidine Based Sphingosine Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2766–2778.

(5) Xiang, Y.; Hirth, B.; Kane, J. L. J.; Liao, J.; Noson, K. D.; Yee, C.; Asmussen, G.; Fitzgerald, M.; Klaus, C.; Booker, M. Discovery of Novel Sphingosine Kinase-1 Inhibitors. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (15), 4550–4554.

(6) Baek, D. J.; MacRitchie, N.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Bittman, R. Synthesis of Selective Inhibitors of Sphingosine Kinase 1. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (21), 2136–2138.

(7) Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Kasten, T.; Yates, M.; Jerome, G.; Rains, J. W.; Hall, T.; Chrencik, J.; Kraus, M.; Cronin, C. N.; et al. Modulation of Cellular S1P Levels with a Novel, Potent and Specific Inhibitor of Sphingosine Kinase-1. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), 79–88.

(8) Patwardhan, N. N.; Morris, E. A.; Kharel, Y.; Raje, M. R.; Gao, M.; Tomsig, J. L.; Lynch, K. R.; Santos, W. L. Structure−Activity Relationship Studies and in Vivo Activity of Guanidine-Based Sphingosine Kinase Inhibitors: Discovery of SphK1- and SphK2-Selective Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (4), 1879–1899.

(9) Wang, J.; Knapp, S.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Elkins, J. M. Crystal Structure of Sphingosine Kinase 1 with PF-543. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (12), 1329–1333.

(10) Pitman, M. R.; Costabile, M.; Pitson, S. M. Recent Advances in the Development of Sphingosine Kinase Inhibitors. *Cell. Signal.* **2016**, *28* (9), 1349–1363.

(11) Gao, Y.; Gao, F.; Chen, K.; Tian, M.; Zhao, D. Sphingosine Kinase 1 as an Anticancer Therapeutic Target. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3239–3245.

(12) Newton, J.; Lima, S.; Maceyka, M.; Spiegel, S. Revisiting the Sphingolipid Rheostat: Evolving Concepts in Cancer Therapy. *Exp. Cell Res.* **2015**, *333* (2), 195–200.

(13) Santos, W. L.; Lynch, K. R. Drugging Sphingosine Kinases. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 225–233.

(14) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.-H.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; et al. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(15) Pellecchia, M. Fragment-Based Drug Discovery Takes a Virtual Turn. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (5), 274–275.

(16) Zheng, W.; Johnson, S. R.; Baskin, I.; Bajorath, J.; Horvath, D.; Laggner, C.; Langer, T.; Schneider, G.; Filimonov, D.; Poroikov, V.; et al. Chemoinformatics

Approaches to Virtual Screening; *The Royal Society of Chemistry*, **2008**.

(17) Triballeau, N.; Bertrand, H.-O.; Acher, F. Are You Sure You Have a Good Model? In Pharmacophores and Pharmacophore Searches; *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, **2006**; pp 325–364.

(18) Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B.; et al. ChEMBL: A Large-Scale Bioactivity Database for Drug Discovery. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (Database issue), D1100-7.

(19) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.

(20) Sutherland, J. J.; Nandigam, R. K.; Erickson, J. A.; Vieth, M. Lessons in Molecular Recognition. 2. Assessing and Improving Cross-Docking Accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (6), 2293–2302.

(21) O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox. *J. Cheminform.* **2011**, *3* (1), 33.

(22) Vettorazzi, M.; Angelina, E.; Lima, S.; Gonec, T.; Otevrel, J.; Marvanova, P.; Padrtova, T.; Mokry, P.; Bobal, P.; Acosta, L. M.; et al. An Integrative Study to Identify Novel Scaffolds for Sphingosine Kinase 1 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 461–481.

(23) Stanzel, L.; Malík, I.; Mokrý, P. Preliminary In Vitro Investigation of Antioxidant Potential of Ultra Short Acting Arylcarbamoyloxy-Aminopropanols Containing N-Phenylpiperazine, *Moiety*; **2017**; Vol. 15.

(24) Malík, I.; Janošcová, M.; Mokrý, P.; Csöllei, J.; Andriamainty, F. Basic Physicochemical Characterization of New Potential Ultrashort Acting β 1-Adrenoceptor Blockers [Základná Fyzikálno-Chemická Charakteristika Nových Potenciálnych Ultrakrátko Pôsobiacich Blokátorov β 1-Adrenergných Receptorov]. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae* **2009**, *56*, 119–127.

(25) Malík, I.; Bukovský, M.; Mokrý, P.; Csöllei, J. Antimicrobial Profile Investigation of Potential Ultrashort Acting Beta-Adrenoceptor Blocking Compounds Containing N-Phenylpiperazine Moiety. *Glob. J. Med. Res. Pharma, Drug Discov. Toxicol. Med.* **2013**, *13*, 1–4.

(26) Acosta-Quintero, L. M.; Jurado, J.; Nogueras, M.; Palma, A.; Cobo, J. Synthesis of Pyrimidine-Fused Benzazepines from 5-Allyl-4,6-Dichloropyrimidines. *European J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (24), 5360–5369.

(27) Tengler, J.; Kapustíková, I.; Stropnický, O.; Mokrý, P.; Oravec, M.; Csöllei, J.; Jampílek, J. Synthesis of New (Arylcarbonyloxy)aminopropanol Derivatives and the Determination of Their Physico-Chemical Properties. *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, *11* (11), 1757–1767.

(28) Tengler, J.; Kapustíková, I.; Peško, M.; Govender, R.; Keltošová, S.; Mokrý, P.; Kollár, P.; O´Mahony, J.; Coffey, A.; Kráľová, K.; Jampílek, J. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Hydroxy-3-[(2-Aryloxyethyl)amino]propyl 4-[(Alkoxycarbonyl)amino]benzoates. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 274570.

(29) Marvanova, P.; Padrtova, T.; Pekarek, T.; Brus, J.; Czernek, J.; Mokry, P.; Humpa, O.; Oravec, M.; Jampilek, J. Synthesis and Characterization of New 3-(4-Arylpiperazin-1-Yl)-2-Hydroxypropyl 4-Propoxybenzoates and Their Hydrochloride Salts. *Molecules* **2016**, *21* (6).

(30) Gaster, L. M.; Jennings, A. J.; Joiner, G. F.; King, F. D.; Mulholland, K. R.;

Rahman, S. K.; Starr, S.; Wyman, P. A.; Wardle, K. A. (1-Butyl-4-Piperidinyl)methyl 8-Amino-7-Chloro-1,4-Benzodioxane-5-Carboxylate Hydrochloride: A Highly Potent and Selective 5-HT4 Receptor Antagonist Derived from Metoclopramide. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (25), 4121–4123.

(31) Lalut, J.; Tournier, B. B.; Cailly, T.; Lecoutey, C.; Corvaisier, S.; Davis, A.; Ballandonne, C.; Since, M.; Millet, P.; Fabis, F.; et al. Synthesis and Evaluation of Novel Serotonin 4 Receptor Radiotracers for Single Photon Emission Computed Tomography. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 90–101.

(32) Kettmann, V.; Csöllei, J.; Račanská, E.; Švec, P. Synthesis and Structure-Activity Relationships of New β-Adrenoreceptor Antagonists. Evidence for the Electrostatic Requirements for β-Adrenoreceptor Antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26* (9), 843–851.

(33) Koelsch, C.F.; Rolfson, S. T. Synthesis of Certain 3,4-Disubstituted Piperidines. *J. Amer. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 1871–1873.

(34) Ammazzalorso, A.; Amoroso, R.; Bettoni, G.; Fantacuzzi, M.; De Filippis, B.; Giampietro, L.; Maccallini, C.; Paludi, D.; Tricca, M. L. Synthesis and Antibacterial Evaluation of Oxazolidin-2-Ones Structurally Related to Linezolid. *Farmaco* **2004**, *59* (9), 685–690.

(35) Dewar, G.H.; Kapur, H.; Mottram, D. R. Some Potential α-Adrenoreceptor Blocking 1,4-Benzodioxanes and 2,6-Dimethoxyphenoxyethylamines. *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, *18*, 286–290.

(36) Marvanova, P.; Padrtova, T.; Odehnalova, K.; Hosik, O.; Oravec, M.; Mokry, P. Synthesis and Determination of Physicochemical Properties of New 3-(4-Arylpiperazin-1-Yl)-2-Hydroxypropyl 4-Alkoxyethoxybenzoates. *Molecules* **2016**, *21* (12).

(37) Lima, S.; Milstien, S.; Spiegel, S. A Real-Time High-Throughput Fluorescence Assay for Sphingosine Kinases. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (7), 1525–1530.

(38) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

(39) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; et al. *{Amber 14} OR - University of California, San Francisco*; **2014**.

(40) Andujar, S. a; Tosso, R. D.; Suvire, F. D.; Angelina, E.; Peruchena, N.; Cabedo, N.; Cortes, D.; Enriz, R. D. Searching The "biologically Relevant"conformation of Dopamine: A Computational Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 99–112.

(41) Tosso, R. D.; Andujar, S. A.; Gutierrez, L.; Angelina, E.; Rodriguez, R.; Nogueras, M.; Baldoni, H.; Suvire, F. D.; Cobo, J.; Enriz, R. D. Molecular Modeling Study of Dihydrofolate Reductase Inhibitors. Molecular Dynamics Simulations, Quantum Mechanical Calculations, and Experimental Corroboration. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 2018–2032.

(42) Parraga, J.; Cabedo, N.; Andujar, S.; Piqueras, L.; Moreno, L.; Galan, A.; Angelina, E.; Enriz, R. D.; Ivorra, M. D.; Sanz, M. J.; et al. 2,3,9- and 2,3,11-Trisubstituted Tetrahydroprotoberberines as D2 Dopaminergic Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 150–166.

(43) Angelina, E. L.; Andujar, S. A.; Tosso, R. D.; Enriz, R. D.; Peruchena, N. M. Non-Covalent Interactions in Receptor–ligand Complexes. A Study Based on the Electron Charge Density. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27* (2), 128–134.

(44) Parraga, J.; Andujar, S. A.; Rojas, S.; Gutierrez, L. J.; El Aouad, N.; Sanz, M. J.; Enriz, R. D.; Cabedo, N.; Cortes, D. Dopaminergic Isoquinolines with Hexahydrocyclopenta[ij]-Isoquinolines as D2-like Selective Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 27–42.

(45) Pulkoski-Gross, M. J.; Donaldson, J. C.; Obeid, L. M. Sphingosine-1-Phosphate Metabolism: A Structural Perspective. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *50* (4), 298–313.

(46) Adams, D. R.; Pyne, S.; Pyne, N. J. Sphingosine Kinases: Emerging Structure-Function Insights. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41* (5), 395–409.

(47) Parthasarathi, R.; Subramanian, V.; Sathyamurthy, N. Hydrogen Bonding without Borders: An Atoms-in-Molecules Perspective. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (10), 3349–3351.

Capítulo 5

Búsqueda de nuevos inhibidores para SphK2

5.1. Introducción

El esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido mediador bioactivo que se sintetiza mediante dos isoformas de la esfingosina quinasa (SphK1 y SphK2)[1,2]. S1P regula muchas funciones fisiológicas importantes; sin embargo, también tiene un papel patológico en la disfunción autoinmune, la inflamación, el cáncer y muchas otras enfermedades[3–7]. La mayoría de sus acciones están mediadas por la unión y señalización a través de una familia de cinco receptores acoplados a proteína G (S1PR1-5) que conducen a una importante señalización descendente en la inflamación, la inmunidad y el cáncer[8,9].

Aunque SphK1 y SphK2 comparten un alto grado de homología, difieren en peso molecular, distribución tisular y localización subcelular[10]. Específicamente, SphK2 tiene un dominio adicional que no comparte homología con SphK1[11]. La mayoría de las investigaciones hasta la fecha se han centrado en SphK1 debido a su fuerte vínculo con el cáncer y las enfermedades inflamatorias[12–14]. Los datos estructurales informados por Wang y sus colegas en 2013 sobre el sitio activo de SphK1 han contribuido a la comprensión de su mecanismo de acción y desarrollo de los inhibidores de SphK1[15]. Se han informado numerosos inhibidores de SphK1, incluidos algunos muy potentes, como **PF-543**[16]. Por el contrario, se sabe mucho menos con respecto a SphK2.

La atención sobre SphK2 aumentó enormemente después del descubrimiento del fármaco inmunosupresor **FTY720** (Fingolimod). Es un profármaco que es fosforilado *in vivo* por SphK2 a su forma activa **FTY720**-fosfato, un mimético de S1P que modula las funciones de S1PR[17]. Además, el S1P intracelular generado por SphK2 es un inhibidor endógeno de las histonas deacetilasas[9], estabiliza la telomerasa[18] y en las mitocondrias, se une a la prohibitina 2[19] . Estos estudios indican que SphK2 está involucrado en la regulación epigenética, el envejecimiento y la función del complejo respiratorio mitocondrial. Además, SphK2 también regula las vías de IL-2 en las células T[20]. Por lo tanto, se ha sugerido que los inhibidores de SphK2 pueden tener utilidad terapéutica en enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes[20]. Sin embargo, a pesar de estos avances, aún queda mucho por conocer acerca de los papeles fisiológicos y patológicos de esta isoenzima de SphK. Para entender mejor las funciones de SphK2 en la enfermedad autoinmune/inflamatoria, existe la necesidad de desarrollar inhibidores de SphK2 con selectividad sobre SphK1.

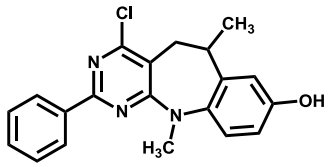
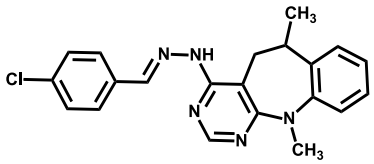
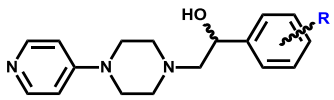
En contraste con SphK1, para el cual se ha desarrollado un gran número de inhibidores, se han descrito muy pocos inhibidores potentes de SphK2 y la mayoría de ellos solo muestran una actividad moderada contra

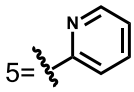
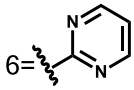
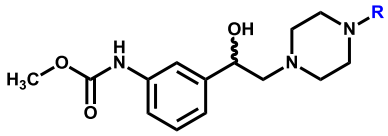
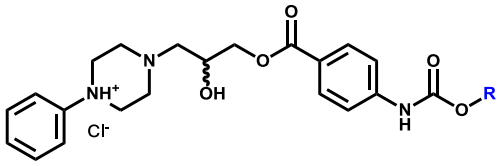
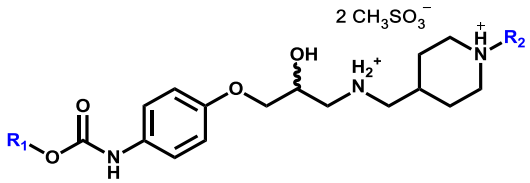
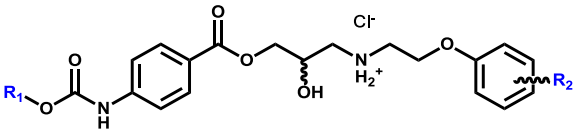
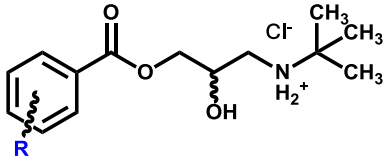
SphK2. Además, la gran mayoría de ellos no son específicos de SphK2, lo que complica aún más la interpretación de sus efectos *in vitro* e *in vivo*. Los inhibidores específicos de isotipo más conocidos de SphK2 son: **ABC294640**[21], **(R)-FTY720-OMe**[22], **K145**[23] y **SLM6031434**[24] uno de los más potentes reportados hasta la fecha.

En el capítulo 4, se describieron dos tipos de andamiajes estructurales para el desarrollo de nuevos inhibidores de SphK1[25]. Estos nuevos compuestos se obtuvieron mediante un cribado virtual, siendo los compuestos más activos de estas series las moléculas **2-4** (Tabla 1). Teniendo en cuenta que hay relativamente pocos inhibidores de SphK2 informados, es interesante determinar si algunos de los compuestos con actividad moderada o nula contra SphK1 inhibirían a SphK2. Por lo tanto, en este capítulo se informa la actividad inhibidora de SphK2 y un enfoque de modelado molecular que permitió diseñar, sintetizar y evaluar los efectos *in vitro* e *in vivo* de un nuevo inhibidor de SphK2. Además, también se examinó el potencial efecto antiinflamatorio de los compuestos.

En este capítulo se presenta el diseño y la síntesis de nuevos inhibidores de SphK2 con nuevos andamiajes estructurales. Estos compuestos se diseñaron a partir de un estudio de modelado molecular, en el que se tuvieron en cuenta las interacciones moleculares que estabilizaban los diferentes complejos.

Tabla 1. Características estructurales de los compuestos seleccionados para evaluar el efecto inhibidor de SphK.

Compuestos	Estructura	IC_{50}	
		SphK1	SphK2
1		> 650 μM	> 650 μM
2		12 μM	28 μM
3= –*m*-NHCOO$(CH_2)_3CH_3$		60 μM	> 650 μM
4= – *p*-NHCOO$(CH_2)_3CH_3$		55 μM	57 μM

5=  6= 		> 650 μM > 650 μM	> 650 μM > 650 μM
7= –CH_3 8= –CH_2CH_3 9= – $(CH_2)_3CH_3$		> 650 μM > 650 μM > 650 μM	> 650 μM > 650 μM > 650 μM
10= R_1= –CH_3 R_2= –$(CH_2)_3CH_3$ 11= R_1= –$(CH_2)_3CH_3$ R_2= –$(CH_2)_3CH_3$ 12= R_1= –CH_3 R_2= –$(CH_2)_2CH_3$		> 650 μM > 650 μM > 650 μM	> 650 μM > 650 μM > 650 μM
13= R_1= –$(CH)_2CH_3$ R_2= –*p*-OCH_3 14= R_1= –$(CH_2)_2OCH_3$ R_2= –(2,6-dimethoxy)		> 650 μM > 650 μM	140 μM > 650 μM
15= –*o*-$O(CH_2)_2OCH_3$ 16= –*p*-$O(CH_2)_3CH_3$		> 650 μM > 650 μM	> 650 μM > 650 μM

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de SphK2

Primero se evalúo la actividad inhibitoria de SphK2 de los 16 compuestos de la selección previa de inhibidores de SphK1[25]. La síntesis y caracterización estructural de los compuestos **1-16** ha sido descripta en el capítulo 4 y sus estructuras se muestran en la Tabla 1[25–28]. Los inhibidores de SphK2 se evaluaron en un ensayo de formato de alto rendimiento de 384 pocillos como se describe en la sección de metodología de esta tesis y en siguiente publicación[29]. De estos compuestos, solo tres mostraron una significativa actividad inhibidora contra SphK2: los compuestos **2**, **4** y **13** (Figura 1).

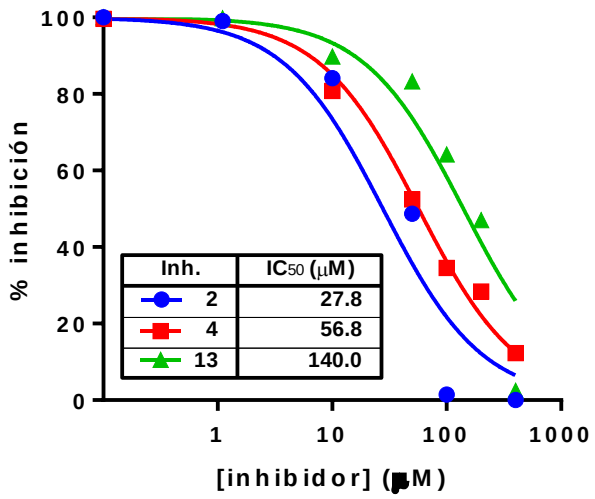


Fig. 1. Gráfico de inhibición porcentual de SphK2 *versus* la concentración para los compuestos **2**, **4** y **13**.

El compuesto **2**, que tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre SphK1 (IC_{50} = 12 μM), también mostró la actividad inhibitoria más fuerte contra SphK2 (IC_{50} = 27,8 μM). En cambio, los compuestos **4** y **13** mostraron una actividad inhibitoria moderada con valores de 56,8 y 140 μM, respectivamente.

Es importante señalar que utilizando la misma técnica de medición, **K145** suprimió la actividad de SphK2 con un IC_{50} de 33,7 μM[29], que es comparable con el valor de IC_{50} determinado con el ensayo radioactivo convencional[23]. Por lo tanto, es posible considerar que los efectos inhibidores encontrados para el compuesto **2** son comparables a los reportados para **K145** y por lo tanto ellos son muy significativos. Sin embargo, para buscar un nuevo inhibidor de SphK2 con un nuevo andamiaje estructural altamente selectivo para SphK2, se realizó un estudio de modelado molecular utilizando estructuras de partida basadas en los compuestos **2**, **4** y **13**.

El ensayo utilizado para medir compuestos con actividad inhibitoria

contra SphK se ha caracterizado ampliamente y se ha demostrado que reproduce el IC_{50} de manera confiable para inhibidores conocidos de SphK[29]. De cualquier manera, en los ensayos se utilizó un control positivo de **K145** a una concentración de 50 μM para la inhibición de SphK2 y no se observó actividad de SphK2 en estas condiciones.

5.2.2. Modelado Molecular

Se llevó a cabo un estudio de simulación molecular para identificar las interacciones moleculares más importantes entre los compuestos **2**, **4** y **13** con los residuos del sitio activo de SphK2. Dado que no hay estructura cristalina actualmente disponible para SphK2, se generó un modelo estructural de SphK2 usando MODELLER[30], un programa comparativo de modelado de estructura de proteínas, usando la estructura de SphK1 (homo sapiens) (PDB ID: 3VZB, 3VZC, 3VZD, 4L02 , 4V24) como plantilla[15,31,32].

El objetivo principal de este estudio fue evaluar las interacciones que estabilizan o desestabilizan los complejos ligando-receptor (L-R). Como referencia, también incluimos los compuestos específicos del isotipo SphK2, **K145**[23] y **SLM6031434**[24] que son los inhibidores de SphK2 más fuertes y selectivos descubiertos hasta la fecha. Se realizó este estudio para producir un análisis comparativo de diferentes actividades inhibitorias de SphK2 de estas moléculas en relación con sus diferencias estructurales (Figura 2).

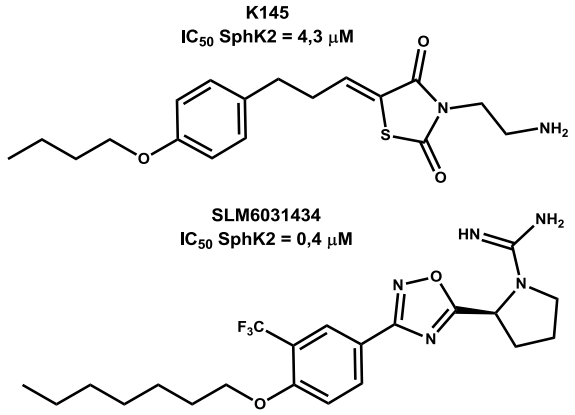


Fig. 2. Características estructurales de **K145** y **SLM6031434**.

El estudio de modelado molecular se realizó en tres etapas diferentes. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de docking utilizando el programa de AutoDock[33]. En la segunda etapa, las simulaciones de dinámica molecular (DM) se realizaron utilizando el paquete de software AMBER14[34]. A partir de las trayectorias obtenidas con las simulaciones de DM, se realizó un análisis por residuo para cada compuesto.

El análisis de docking indicó que todos los compuestos encajan en el bolsillo de unión de SphK2 de manera similar a **K145** (Figura 3a). Como puede verse en la Figura 3b, el compuesto **SLM6031434** se ubica en otra

parte del sitio activo totalmente diferente a **K145**. Esto también se evidencia en el análisis por residuos que ayudó a definir las principales interacciones que estabilizan los diferentes complejos (Figura 4). En general, los nuevos inhibidores de SphK2 descriptos aquí muestran la parte farmacofórica en el sitio activo de una manera similar que **K145**[23], por lo tanto este compuesto fue tomado como referencia para continuar con el estudio.

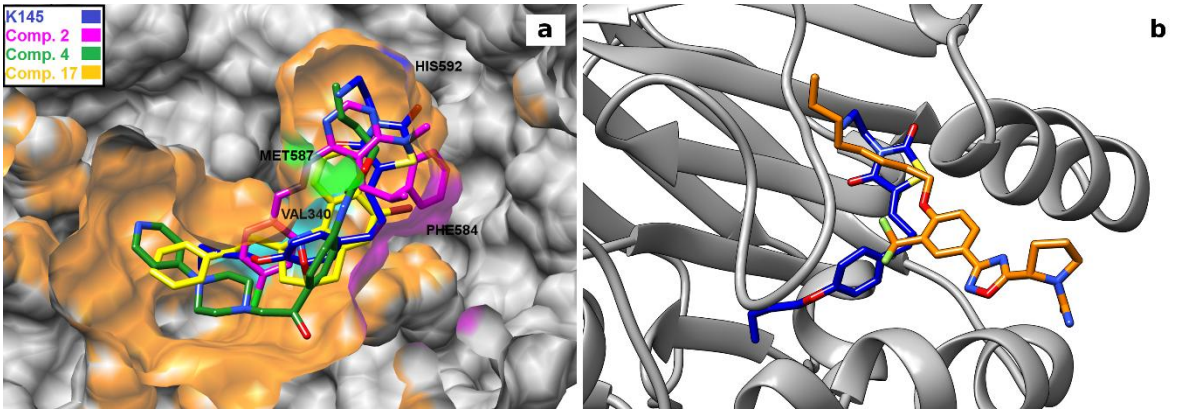


Fig. 3. (a) Vista espacial de la superposición de los siguientes compuestos: **K145** (azul), **2** (magenta), **4** (verde) y **17** (amarillo). Estos compuestos están interactuando en el sitio activo de SphK2. Los principales aminoácidos implicados en la formación de los complejos también se muestran en esta figura. **(b)** Vista espacial de la superposición de **K145** (azul) y **SLM6031434** (naranja) dentro del sitio activo. Todas las estructuras se tomaron de un proceso de clusterización en el que se consideraron los últimos 40 ns de cada una de las tres simulaciones.

Las simulaciones de DM indican que los residuos que participan en la estabilización de las interacciones inhibidores-enzima son: F339, V340, F358, L540, L542, L549, C569, F584, M587, H592 y L600. Se obtuvieron histogramas similares para los compuestos **2**, **4** y **13** (Figura 5). Debe señalarse que las simulaciones de DM predijeron la conservación entre los aminoácidos que estabilizan los compuestos **2**, **4** y **13** con SphK2. Por lo tanto, se puede concluir que estos compuestos se unen de manera similar a **K145** ya que esencialmente interactúan con los mismos residuos de SphK2. En base a estos resultados, se buscó diseñar compuestos que estuvieran estructuralmente relacionados con los compuestos **2**, **4** y **13**, y que tuvieran similitudes muy cercanas con los histogramas de unión a SphK2 simulados.

En la Figura 6 se muestran las estructuras obtenidas a partir del docking de los compuestos **3** y **4** en SphK2 (color cian y verde, respectivamente). El compuesto **3** es selectivo para SphK1 con un IC_{50} de 60 μM, mientras que el compuesto **4** posee un IC_{50} de 55 μM y 56,8 μM para SphK1 y SphK2, respectivamente.

Como puede observarse por el análisis de docking, si bien estos compuestos son isómeros, se ubican de manera muy diferente en el sitio activo de la enzima. Esto nos podría dar un indicio de porque uno es selectivo mientras el otro no lo es. Del estudio de docking se obtuvieron 200

conformaciones de las cuales se graficó la de menor energía para cada caso. En el caso del compuesto **4** se representó la configuración preferida tanto energética como poblacionalmente y para el compuesto **3** estas dos variables no coincidían, así que se tuvo en cuenta la favorecida enérgicamente.

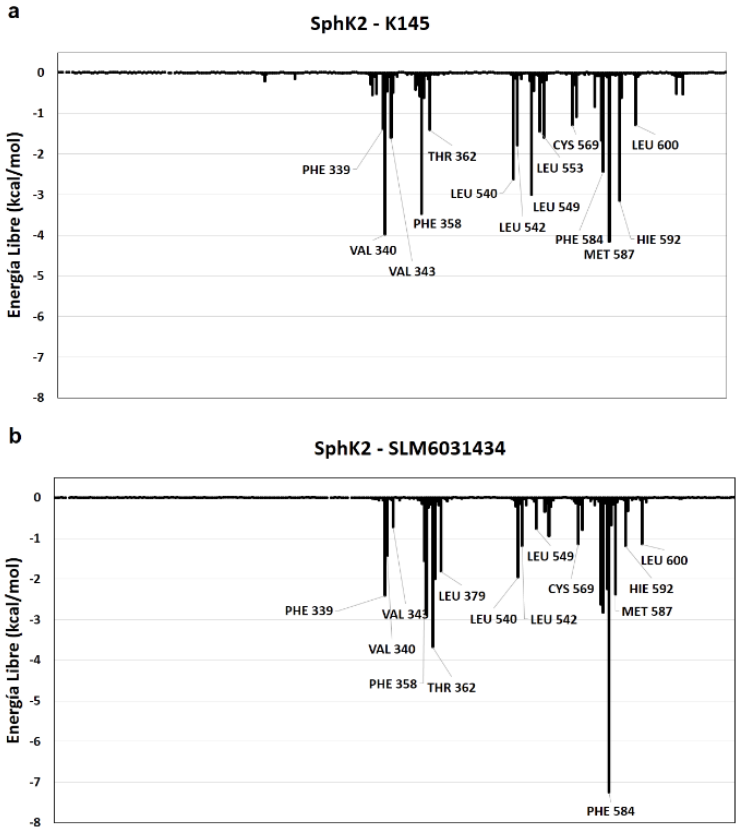


Fig. 4. Los histogramas muestran las energías de interacción obtenidas para los inhibidores específicos **K145 (a)** y **SLM6031434 (b)** con los aminoácidos principales implicados en la formación del complejo.

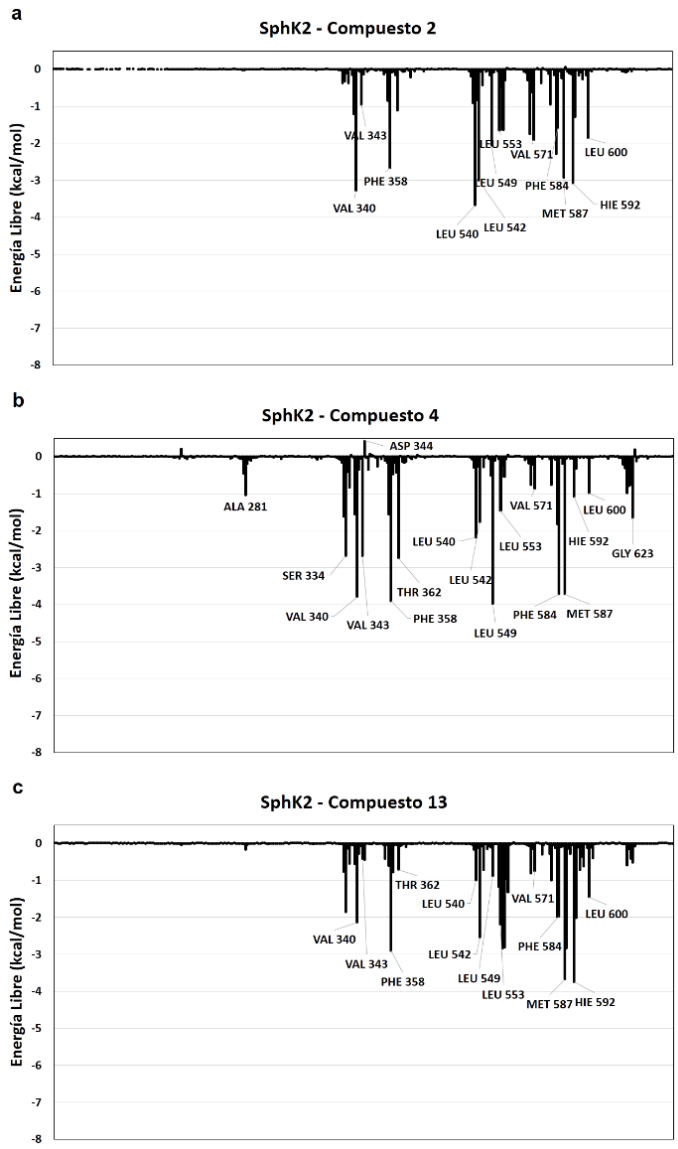


Fig. 5. Los histogramas muestran las energías de interacción obtenidas para los compuestos **2 (a)**, **4 (b)** y **13 (c)** con los aminoácidos principales implicados en la formación del complejo.

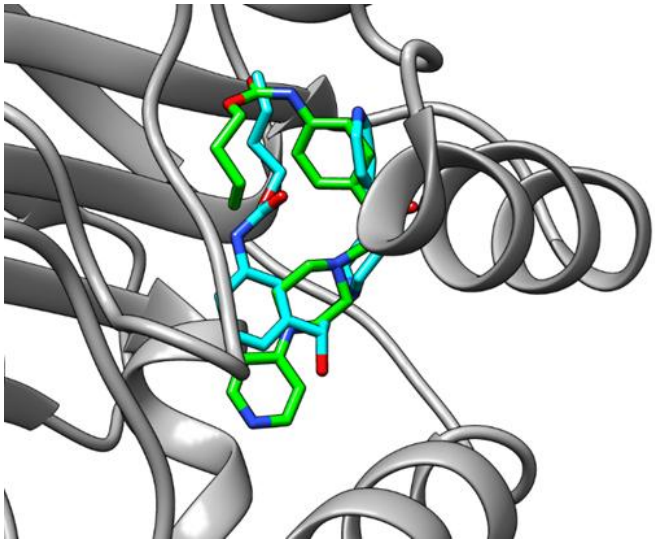
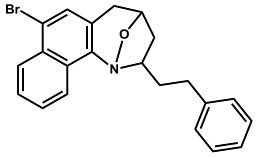
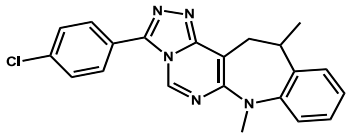
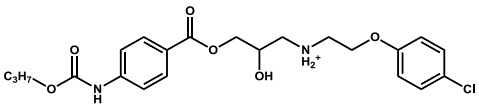
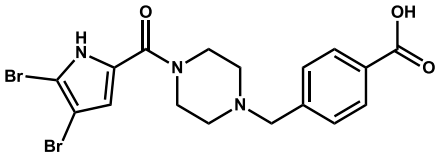
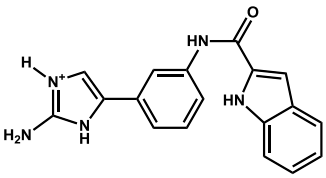
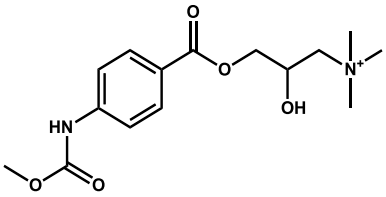
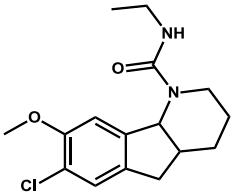
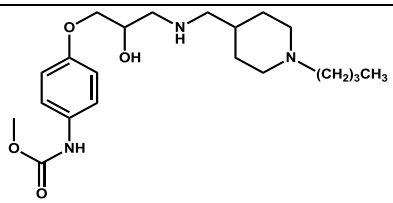


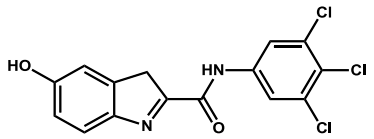
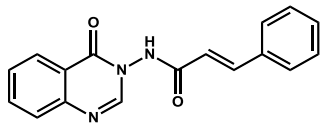
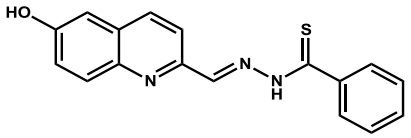
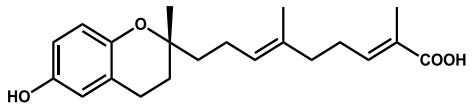
Fig. 6. Disposición estructural de los compuestos **3** (cian) y **4** (verde) dentro del sitio activo de SphK2, obtenidos mediante estudios de docking, considerando la pose de menor energía.

5.2.3. Diseño de nuevos inhibidores de SphK2

Se identificaron varios compuestos sintetizables con modificaciones en las estructuras básicas de los compuestos **2**, **4** y **13** en el análisis de docking y las simulaciones de DM. De los doce inhibidores potenciales de SphK2 (Tabla 2), solo 7-bromo-2-(2-feniletil)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2-*b*]azepina (**17**) y cloruro de N-[2-(4-fluorofenoxi)etil]-2-hidroxi-3-({4-[(propoxicarbonil)amino]benzoil}oxi)propan-1-aminio (**18**) (Tabla 2) se comportaron en las simulaciones, de manera similar a los inhibidores de SphK2 conocidos. Como se muestra en la Figura 7 y la Figura 3a (para el compuesto 17), la unión en el sitio activo de SphK2 es muy similar a los obtenidos para los compuestos **2**, **4** y **13** (Figura 5a-c), como lo fueron también para las simulaciones con el compuesto de referencia, **K145** (Figura 4a).

Tabla 2. Características estructurales de compuestos simulados como posibles inhibidores de SphK2.

Comp	Estructura	Comp	Estructura
17		**23**	
18		**24**	
19		**25**	
20		**26**	

21		**27**	
22		**28**	

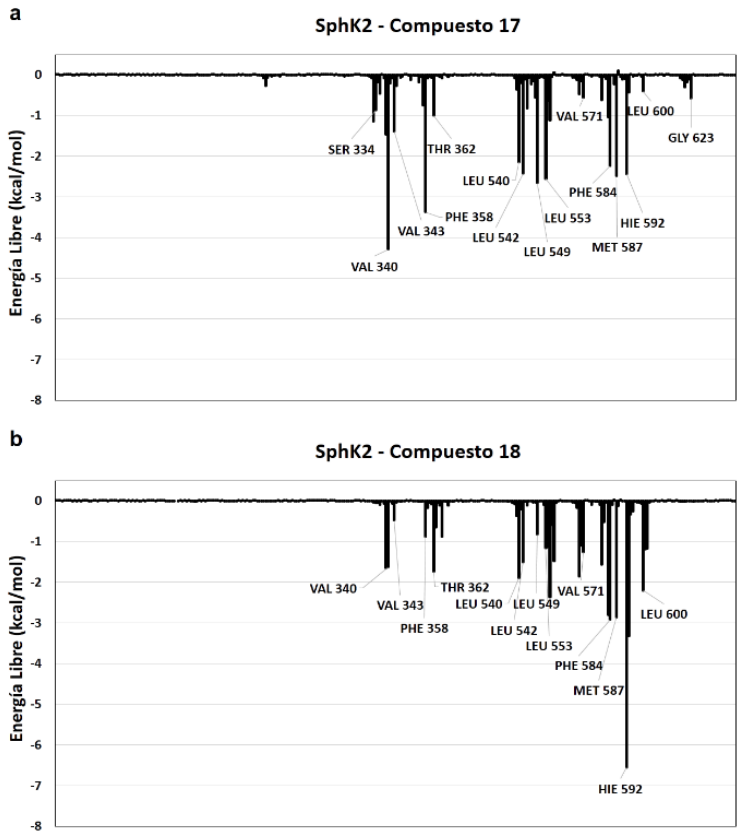
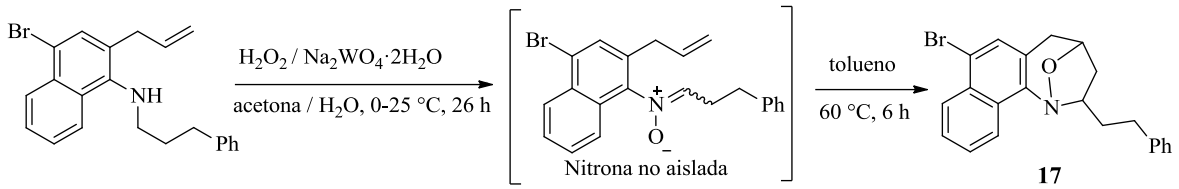


Fig. 7. Los histogramas muestran las energías de interacción obtenidas para **17 (a)** y **18 (b)** con los principales aminoácidos implicados en la formación del complejo.

5.2.4. Síntesis e inhibición de los compuestos 17 y 18

Los compuestos **17** y **18** se sintetizaron y evaluaron para determinar su actividad inhibidora frente a SphK2. El compuesto **17** se sintetizó como se informó en el capítulo 4 y con más detalle en las referencias[35,36], e implicó la oxidación selectiva de la correspondiente 2-alil-4-bromo-N-(3-fenilpropil)naftalen-1-amina con un exceso de solución de peróxido de

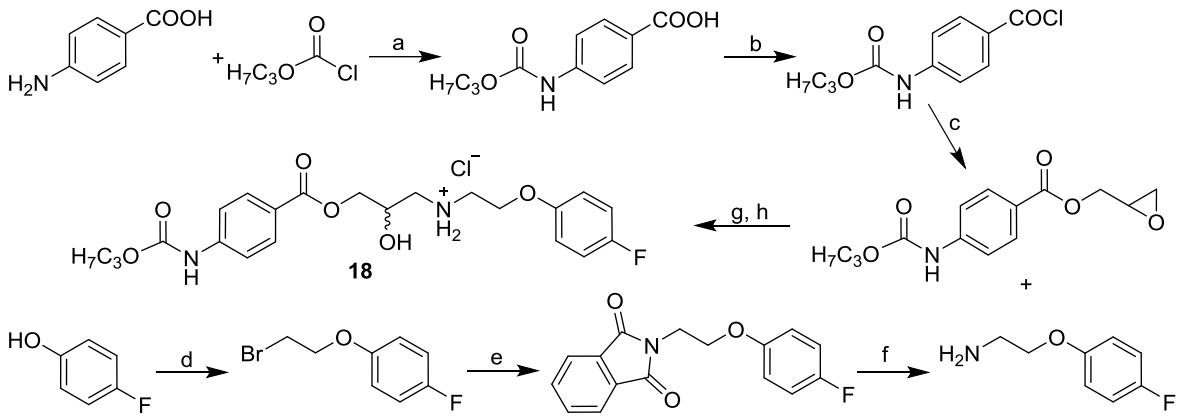
hidrógeno en el presencia de una cantidad catalítica de tungstato de sodio. La posterior cicloadición 1,3-dipolar interna de la nitrona resultante hacia el enlace C=C terminal del fragmento alílico conectado a la posición orto, dio el producto de carga de 1,4-epoxi tricíclico (**17**) (Esquema 1). En estas condiciones, la cicloadición 1,3-dipolar intramolecular inducida térmicamente de la nitrona intermedia era completamente estereoselectiva, conduciendo a la formación exclusiva de la 2-exo-cicloaducción, como se demostró mediante espectroscopía de ^{1}H-NMR. La estereoquímica se dedujo del desplazamiento químico y los valores constantes de acoplamiento de los protones en los protones del anillo 1,4-epoxitetrahidroazepina, y especialmente debido a la ausencia de correlación entre protones terciarios 2-H y 4-H en el espectro NOESY. El compuesto **17** se obtuvo como una mezcla racémica de formas (2R, 4S) y (2S, 4R).



Esquema 1. Síntesis de (2RS, 4SR)-7-bromo-2-(2-feniletil)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto [1,2-*b*] azepina (**17**).

El cloruro de N-[2-(4-fluorofenoxi)etil]-2-hidroxi-3-({4-[(propoxicarbonil) amino]benzoil} oxi) propan-1-aminio (**18**) fue sintetizado por las reacciones de múltiples etapas mostrado en el Esquema 2 y descrito por Tengler et al.[37]. Brevemente, se preparó oxiran-2-ilmetil-4-[(propoxicarbonil)amino]benzoato a partir del ácido 4-aminobenzoico por reacción con cloroformiato de propilo que produjo ácido 4-[(propoxicarbonil) amino]benzoico que se convirtió en propilo[4-(clorocarbonil)fenil]carbamato por reacción con cloruro de tionilo. El epóxido deseado se formó después de la reacción de [4-(clorocarbonil)fenil]carbamato de propilo con 2,3-epoxipropan-1-ol. El anillo de oxirano se abrió mediante la adición de 2-(4-fluorofenoxi)etanamina preparada por síntesis de Gabriel a partir de 4-fluorofenol a través de 1-(2-bromoetoxi)-4-fluorobenceno y 1-(2-bromoetoxi)-4-fluorobenceno. El producto, 3-{[2-(4-fluorofenoxi)etil]amino}-2-hidroxipropil 4-[(propoxicarbonil)amino]benzoato, se transformó en las sales de hidrocloruro con mayor solubilidad en agua usando HCl etéreo.

Los ensayos de inhibición de SphK2 se realizaron como se describió previamente en el capítulo 4[29] con **17** y **18**. El compuesto **17** mostró una mayor capacidad inhibitoria de SphK2 (71,0 µM), mientras que el compuesto **18** expresó solo actividad moderada (131,7 µM), véase la Figura 8. Curiosamente, el compuesto **17** inhibe SphK2 pero no tiene efecto inhibitorio sobre SphK1.



Esquema 2. Síntesis de cloruro de N-[2-(4-fluorofenoxi)etil]-2-hidroxi-3-({4-[(propoxicarbonil) amino]benzoil} oxi) propan-1-aminio (**18**)[37]. *Reactivos y condiciones*: a) acetona, piridina; b) $SOCl_2$, tolueno; c) 2,3-epoxipropan-1-ol, THF, TEA; d) 1,2-dibromoetano, NaOH; e) ftalimida de potasio, KI, DMF; f) $NH_2NH_2.H_2O$, etanol; g) propan-2-ol; h) HCl, Et_2O.

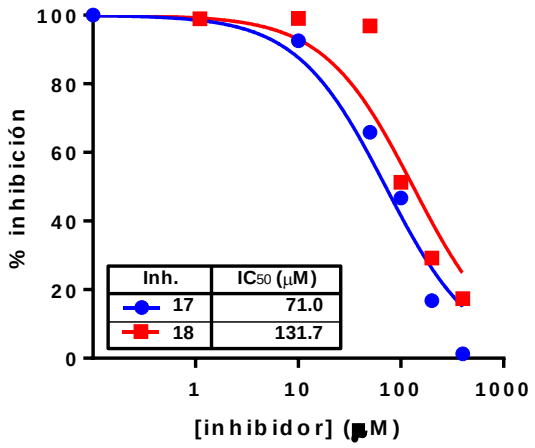


Fig. 8. La inhibición porcentual de SphK2 *versus* la concentración de inhibidor de los compuestos **17** y **18**.

Como se ha sugerido que el desarrollo de inhibidores selectivos SphK1/SphK2 podría ser útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes[12,38], fue de interés evaluar el efecto antiinflamatorio potencial de **17**. Para establecer comparaciones adecuadas, se evaluaron los compuestos **2**, **3**, **4** y **17**. Con respecto a estos resultados, el compuesto **2** fue el más potente de la serie, pero no isotipo selectivo (IC_{50} SphK1 = 12 μM e IC_{50} SphK2 = 28 μM); el compuesto **4** inhibió ambas enzimas pero más débil que **2** (IC_{50} SphK1 = 55 μM e IC_{50} SphK2 = 56 μM); el compuesto **3** fue selectivo para SphK1 (IC_{50} SphK1 = 60 μM) y el compuesto **17** inhibió selectivamente SphK2 (IC_{50} SphK2 = 71 μM). Es interesante remarcar, que el compuesto **17** no muestra ningún efecto inhibitorio contra SphK1 incluso a altas concentraciones (650 μM).

5.2.5. Ensayo de viabilidad celular

Los efectos de citotoxicidad de estos compuestos sobre la viabilidad celular se determinaron mediante ensayo de MTT. El compuesto **2**, con un sistema de benzo[*b*]pirimido[5,4-f]azepina, mostró una alta citotoxicidad en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y neutrófilos humanos, disminuyendo la viabilidad celular en más del 40% a 10 μM (Figura 9a y 9b).

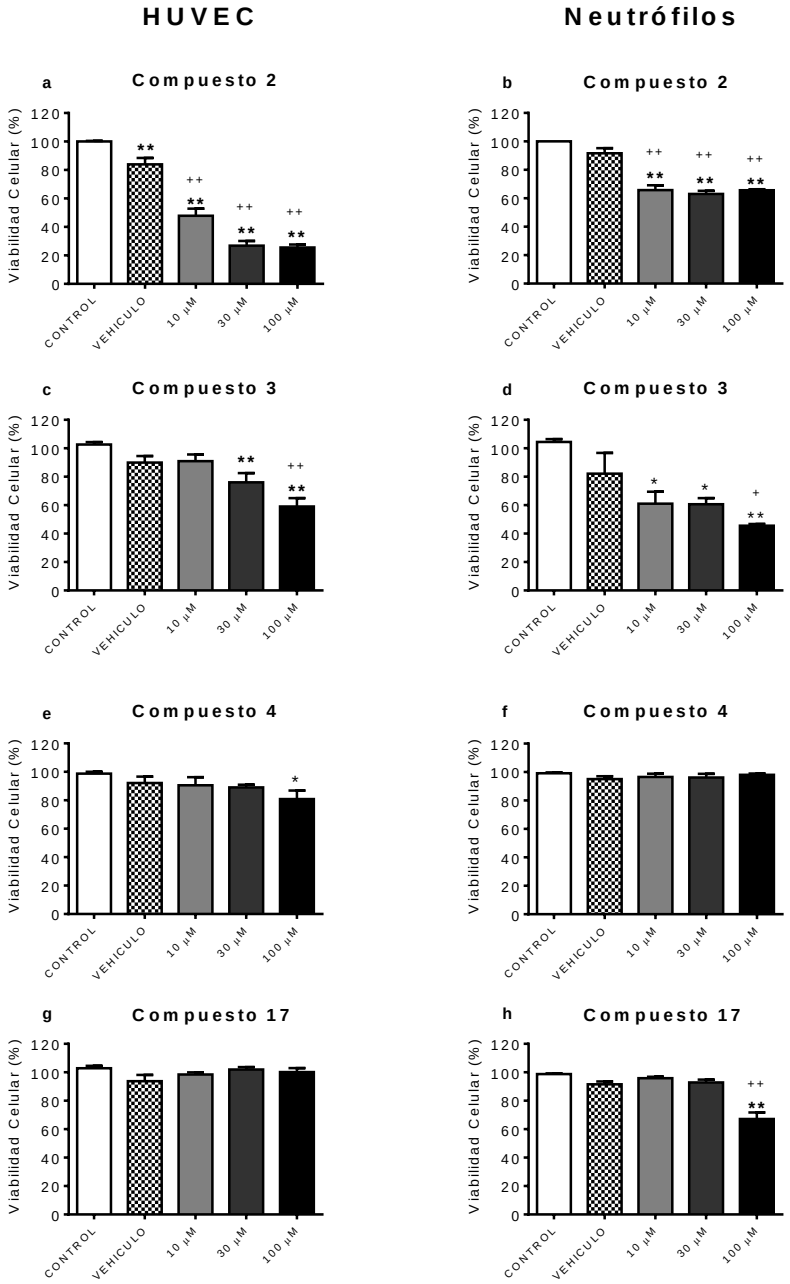


Fig. 9. HUVEC y la viabilidad de neutrófilos humanos después de 24 horas de incubación con cuatro inhibidores de esfingosina quinasa. Las células se incubaron con los compuestos **2**, **3**, **4** y **17** a 10, 30 y 100 μM, solo con medio (control) o medio más vehículo (vehículo, 0,04% DMSO en medio), durante 24 horas y se realizó el ensayo de MTT. Los datos se presentan como media ± SEM del porcentaje de células viables en n=5 experimentos independientes. * p <0,05, o ** p <0,01 versus control, + p <0,05 o ++ p <0,01 vs vehículo.

El compuesto **3** mostró citotoxicidad en HUVEC a 30 μM y resultó citotóxico para neutrófilos a todas las concentraciones ensayadas (10-100 μM) (Figura 9c y 9d). Por el contrario, el compuesto **4**, un isómero de **3**, no mostró toxicidad a 100 μM en HUVEC cuando se comparó con el vehículo (DMSO al 0,04% en medio). El compuesto **17**, solo mostró una toxicidad significativa a la dosis máxima de 100 μM en neutrófilos humanos, pero la viabilidad celular se mantuvo por encima del 70% (Figura 9e-h).

5.2.6. Adhesión celular en endotelio disfuncional

La inflamación y especialmente la adhesión de las células mononucleares al endotelio disfuncional desempeñan un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis[39]. Uno de los eventos clave en el proceso inflamatorio implica la adhesión endotelial-leucocitaria y su posterior emigración al espacio extravascular[40]. Para examinar el efecto de la inhibición de SphK2 con los compuestos menos tóxicos **4** y **17** sobre la adhesión de leucocitos, se llevaron a cabo ensayos de cámara de flujo de placas paralelas. Este ajuste experimental permite estudios de interacciones leucocito-célula endotelial bajo condiciones de flujo que imitan la dinámica de fluidos fisiológicos *in vivo* dentro de los vasos sanguíneos de la microcirculación. Cuando los neutrófilos se perfundieron a través de células endoteliales estimuladas con TNFα, se observó una adhesión de leucocitos significativa en comparación con la adhesión a células endoteliales no estimuladas (DMSO al 0,04%, Figura 10). La preincubación con el compuesto **4** antes de la estimulación de TNFα, no afectó la adhesión de neutrófilos inducida por TNFα a células endoteliales a la concentración ensayada (100 μM, Figura 10). Cuando las células endoteliales se incubaron con el compuesto **17**, aunque se encontró inhibición de la detención de neutrófilos en el endotelio disfuncional (estimulado por TNFα), la reducción en este parámetro fue inferior al 50% (43,4%) a 100 μM (Figura 10).

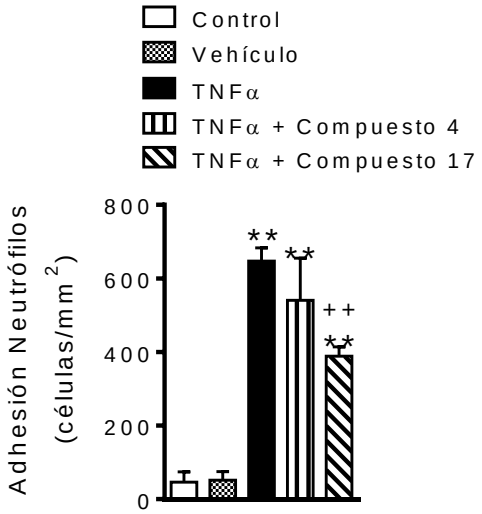


Fig. 10. El compuesto **17** y **4** en menor medida, inhiben modestamente la adhesión de neutrófilos al endotelio disfuncional (estimulado por TNFα). Las células se pretrataron durante 24 hs. con el compuesto **4** o **17** (100 μM) antes de la estimulación con TNFα (20 ng/ml, 24 hs.). Los neutrófilos humanos recién aislados se perfundieron a través de las monocapas endoteliales durante 5 minutos a 0,5 dinas/cm^2 y se cuantificó la adhesión de neutrófilos. Los resultados son la media ± SEM de 4-6 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ frente a vehículo, ++ $p < 0,01$ frente a células estimuladas con TNFα.

Los compuestos **4** y **17** se ensayaron primero a 100 μM para evaluar su impacto sobre la adhesión de células mononucleares. A esta concentración, mientras que el compuesto **4** no afectó significativamente la adhesión endotelial de células mononucleares inducida por TNFα, el compuesto **17** sí lo hizo (Figura 11a). Dado que este efecto se inhibió en un 70%, a 100 μM, el efecto del compuesto **17** se analizó dentro de un intervalo de concentración de 0,1 a 100 μM. Es interesante notar que el compuesto **17** inhibió de manera dependiente de la concentración la adhesión de células endoteliales leucocitarias mononucleares provocada por TNFα (Figura 11b) con un IC_{50} estimado de 3 μM. Estos resultados son relevantes dado que el efecto sobre el reclutamiento de células mononucleares ejercido por el compuesto **17** difiere de los mostrados en neutrófilos, sugiriendo que no puede comprometer significativamente las respuestas neutrofílicas que son necesarias para la defensa del huésped innato.

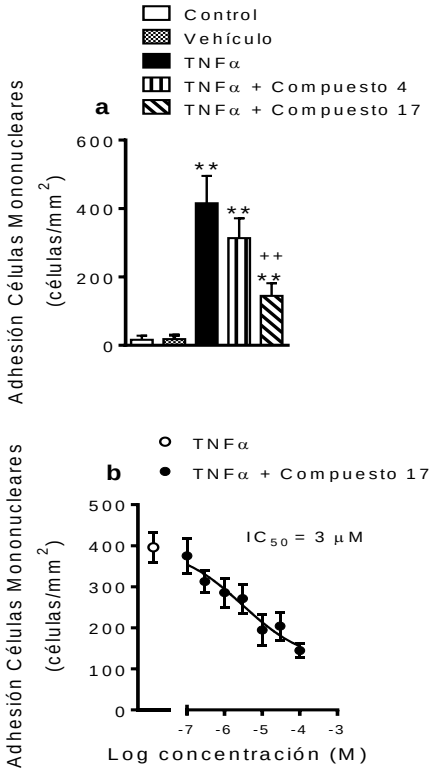


Fig. 11. El compuesto **17** inhibe la adhesión de células mononucleares al endotelio disfuncional (estimulado por TNFα) de una manera dependiente de la concentración. **(a)** Las células se pretrataron durante 24 hs. con el compuesto **4** o **17** (100 μM) antes de la estimulación con TNFα (20 ng/ml, 24 hs.). Las células mononucleares humanas recién aisladas se perfundieron a través de las monocapas endoteliales durante 5 min a 0,5 dinas/cm² y se cuantificó la adhesión de las células mononucleares. **(b)** Las células se pretrataron durante 24 hs. con el compuesto **17** (0,1-100 μM) antes de la estimulación con TNFα (20 ng / ml, 24 hs.). Las células mononucleares humanas recién aisladas se perfundieron a través de las monocapas endoteliales durante 5 min a 0,5 dinas/cm² y se cuantificó la adhesión de células mononucleares. Los resultados son la media ± SEM de 4-6 experimentos independientes. ** $p<0,01$ vs vehiculo, ++ $p<0,01$ vs células estimulados con TNFα.

Con el fin de explorar los mecanismos implicados en la disminución de la adhesión de células mononucleares a células endoteliales provocadas por el compuesto **17**, seguidamente se investigó su efecto sobre la expresión de la molécula de adhesión de células endoteliales (CAM) y sobre la regulación de fractalquinas (CX3CL1). El TNFα causó una expresión endotelial aumentada de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, Figura 12a), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, Figura 12b) y la quimiocina fractalquina unida a la membrana (CX3CL1, Figura 12c). Es

interesante señalar que tanto VCAM-1 como fractalquina (CX3CL1) se expresan principalmente en la vasculatura en sitios propensos a la formación de lesiones de aterosclerosis y aquí mostramos que la preincubación de células endoteliales con el compuesto **17** a 10 μM reduce significativamente el TNFα inducida por ICAM-1 (a), VCAM-1 (b) y fractalquina (CX3CL1, (c)) expresión por 60,0; 60,2 y 59,1% respectivamente (Figura 12).

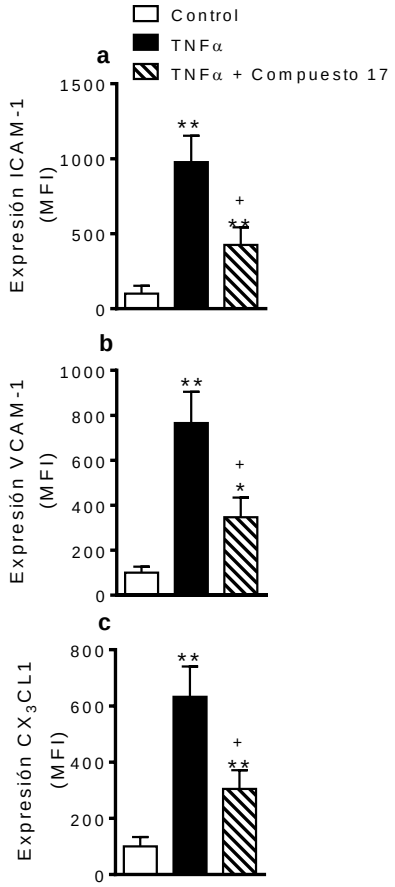


Fig. 12. El compuesto **17** inhibe la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y CX3CL1 inducida por TNFα en HUVEC. Algunas células se pretrataron con el compuesto **17** (10 μM) 24 hs. antes de la estimulación con TNFα (20 ng / ml, 24 hs.). La expresión de ICAM-1 **(a)**, VCAM-1 **(b)** y CX3CL1 **(c)** se determinó por citometría de flujo. Los resultados (media ± SEM) se expresan como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de n = 6 experimentos independientes. * p <0,05 o ** p <0,01 con respecto al grupo del vehículo, + p <0,05 o ++ p <0,01 con respecto a las células estimuladas con TNFα.

En conclusión, los resultados indican que el compuesto **17** que es un inhibidor selectivo de SphK2, no muestra toxicidad hacia las células humanas y es capaz de inhibir la adhesión de células mononucleares al endotelio disfuncional sin afectar marcadamente la infiltración de neutrófilos. Estas respuestas están mediadas en parte por la molécula de adhesión de células endoteliales y la expresión fractalquina (CX3CL1). Por lo tanto, el compuesto **17** es un candidato potencial para usarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios en los que el reclutamiento de células mononucleares desempeña un papel prominente, tal como enfermedades cardiovasculares asociadas a trastornos cardiometabólicos.

5.3. Conclusiones

En este capítulo, utilizamos un estudio de modelado molecular que permitió diseñar y sintetizar nuevos inhibidores de SphK2 con nuevos andamiajes estructurales. Es particularmente interesante el compuesto **17** que es un inhibidor selectivo de SphK2 y no tiene ningún efecto citotóxico y que por otra parte tiene un potente efecto antiinflamatorio ya que inhibe la adhesión de células mononucleares al endotelio disfuncional.

Cabe señalar que el compuesto **17** muestra una actividad antiinflamatoria de una manera dependiente de la concentración con un IC_{50} en el rango micromolar, mientras que su efecto inhibitorio sobre SphK2 es solo moderado. Por lo tanto, según estos resultados, no se puede decir que la actividad antiinflamatoria de este compuesto se deba únicamente a la acción sobre esta enzima. Sin embargo, está claro que su actividad biológica se debe, al menos en parte, al efecto inhibitorio mencionado anteriormente. Por otro lado, su perfil lo convierte en una interesante estructura de inicio para la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos de SphK2, así como nuevos agentes antiinflamatorios.

Es importante mencionar que 7-bromo-2-(2-feniletil)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2-*b*]azepina (**17**) se obtuvo a partir de un estudio de modelado molecular llevado a cabo en base a la estructura de 4-[(2E)-2-(4-clorobencilideno)hidrazinil]-6,11-dimetil-6,11-dihidro-5*H*-pirimido[4,5-*b*][1]benzazepina (**2**) y usando **K145** como estructura de control. Por lo tanto, la información obtenida de este modelo teórico basado en las interacciones moleculares involucradas en la estabilización de los diferentes complejos, puede ser útil para la búsqueda de nuevos inhibidores del reclutamiento de SphK2, que desempeña un papel destacado, como las enfermedades inflamatorias y cardiovasculares.

5.4. Referencias

(1) Liu, H.; Sugiura, M.; Nava, V. E.; Edsall, L. C.; Kono, K.; Poulton, S.; Milstien, S.; Kohama, T.; Spiegel, S. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoform. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (26), 19513–19520.

(2) Kohama, T.; Olivera, A.; Edsall, L.; Nagiec, M. M.; Dickson, R.; Spiegel, S. Molecular Cloning and Functional Characterization of Murine Sphingosine Kinase. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 23722–23728.

(3) Hait, N. C.; Maiti, A. The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 4806541.

(4) Spiegel, S.; Milstien, S. The Outs and the Ins of Sphingosine-1-Phosphate in Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 403–415.

(5) Tsuchida, J.; Nagahashi, M.; Takabe, K.; Wakai, T. Clinical Impact of Sphingosine-1-Phosphate in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 2076239.

(6) Mohammed, S.; Harikumar, K. B. Sphingosine 1-Phosphate: A Novel Target for Lung Disorders. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 296.

(7) Rohrbach, T.; Maceyka, M.; Spiegel, S. Sphingosine Kinase and Sphingosine-1-Phosphate in Liver Pathobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *52* (5), 543–553.

(8) Takabe, K.; Paugh, S. W.; Milstien, S.; Spiegel, S. "Inside-Out" signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60* (2), 181–195.

(9) Hait, N. C.; Allegood, J.; Maceyka, M.; Strub, G. M.; Harikumar, K. B.; Singh, S. K.; Luo, C.; Marmorstein, R.; Kordula, T.; Milstien, S.; et al. Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **2009**, *325* (5945), 1254–1257.

(10) Siow, D.; Wattenberg, B. The Compartmentalization and Translocation of the Sphingosine Kinases: Mechanisms and Functions in Cell Signaling and Sphingolipid Metabolism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *46* (5), 365–375.

(11) Don, A. S.; Rosen, H. A Lipid Binding Domain in Sphingosine Kinase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380* (1), 87–92.

(12) Shida, D.; Takabe, K.; Kapitonov, D.; Milstien, S.; Spiegel, S. Targeting SphK1 as a New Strategy against Cancer. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 662–673.

(13) Bouquerel, P.; Gstalder, C.; Müller, D.; Laurent, J.; Brizuela, L.; Sabbadini, R. A.; Malavaud, B.; Pyronnet, S.; Martineau, Y.; Ader, I.; et al. Essential Role for SphK1/S1P Signaling to Regulate Hypoxia-Inducible Factor 2α Expression and Activity in Cancer. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e209.

(14) Tan, S. S. L.; Khin, L. W.; Wong, L.; Yan, B.; Ong, C. W.; Datta, A.; Salto-Tellez, M.; Lam, Y.; Yap, C. T. Sphingosine Kinase 1 Promotes Malignant Progression in Colon Cancer and Independently Predicts Survival of Patients With Colon Cancer by Competing Risk Approach in South Asian Population. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2014**, *5*, e51.

(15) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.-H.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; et al. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(16) Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Kasten, T.; Yates, M.; Jerome, G.; Rains, J. W.; Hall, T.; Chrencik, J.; Kraus, M.; Cronin, C. N.; et al. Modulation of Cellular S1P

Levels with a Novel, Potent and Specific Inhibitor of Sphingosine Kinase-1. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), 79–88.

(17) Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.; Aradhye, S.; Burtin, P. Fingolimod (FTY720): Discovery and Development of an Oral Drug to Treat Multiple Sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (11), 883–897.

(18) Panneer Selvam, S.; De Palma, R. M.; Oaks, J. J.; Oleinik, N.; Peterson, Y. K.; Stahelin, R. V; Skordalakes, E.; Ponnusamy, S.; Garrett-Mayer, E.; Smith, C. D.; et al. Binding of the Sphingolipid S1P to hTERT Stabilizes Telomerase at the Nuclear Periphery by Allosterically Mimicking Protein Phosphorylation. *Sci. Signal.* **2015**, *8* (381), ra58.

(19) Strub, G. M.; Paillard, M.; Liang, J.; Gomez, L.; Allegood, J. C.; Hait, N. C.; Maceyka, M.; Price, M. M.; Chen, Q.; Simpson, D. C.; et al. Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 in Mitochondria Interacts with Prohibitin 2 to Regulate Complex IV Assembly and Respiration. *FASEB J.* **2011**, *25* (2), 600–612.

(20) Samy, E. T.; Meyer, C. A.; Caplazi, P.; Langrish, C. L.; Lora, J. M.; Bluethmann, H.; Peng, S. L. Cutting Edge: Modulation of Intestinal Autoimmunity and IL-2 Signaling by Sphingosine Kinase 2 Independent of Sphingosine 1-Phosphate. *J. Immunol.* **2007**, *179* (9), 5644–5648.

(21) Yang, J.; Yang, C.; Zhang, S.; Mei, Z.; Shi, M.; Sun, S.; Shi, L.; Wang, Z.; Wang, Y.; Li, Z.; et al. ABC294640, a Sphingosine Kinase 2 Inhibitor, Enhances the Antitumor Effects of TRAIL in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, *16* (8), 1194–1204.

(22) Lim, K. G.; Sun, C.; Bittman, R.; Pyne, N. J.; Pyne, S. (R)-FTY720 Methyl Ether Is a Specific Sphingosine Kinase 2 Inhibitor: Effect on Sphingosine Kinase 2 Expression in HEK 293 Cells and Actin Rearrangement and Survival of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cell. Signal.* **2011**, *23* (10), 1590–1595.

(23) Liu, K.; Guo, T. L.; Hait, N. C.; Allegood, J.; Parikh, H. I.; Xu, W.; Kellogg, G. E.; Grant, S.; Spiegel, S.; Zhang, S. Biological Characterization of 3-(2-Amino-Ethyl)-5-[3-(4-Butoxyl-Phenyl)-Propylidene]-Thiazolidine-2,4-Dione (K145) as a Selective Sphingosine Kinase-2 Inhibitor and Anticancer Agent. *PLoS One* **2013**, *8* (2), e56471.

(24) Kharel, Y.; Morris, E. A.; Congdon, M. D.; Thorpe, S. B.; Tomsig, J. L.; Santos, W. L.; Lynch, K. R. Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355* (1), 23–31.

(25) Vettorazzi, M.; Angelina, E.; Lima, S.; Gonec, T.; Otevrel, J.; Marvanova, P.; Padrtova, T.; Mokry, P.; Bobal, P.; Acosta, L. M.; et al. An Integrative Study to Identify Novel Scaffolds for Sphingosine Kinase 1 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 461–481.

(26) Stanzel, L.; Malík, I.; Mokrý, P. Preliminary In Vitro Investigation of Antioxidant Potential of Ultra Short Acting Arylcarbamoyloxy-Aminopropanols Containing N-Phenylpiperazine Moiety. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**; Vol. 15.

(27) Malík, I.; Janošcová, M.; Mokrý, P.; Csöllei, J.; Andriamainty, F. Basic Physicochemical Characterization of New Potential Ultrashort Acting β 1-Adrenoceptor Blockers [Základná Fyzikálno-Chemická Charakteristika Nových Potenciálnych Ultrakrátko Pôsobiacich Blokátorov β 1-Adrenergných Receptorov]. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae* **2009**, *56*, 119–127.

(28) Malík, I.; Bukovský, M.; Mokrý, P.; Csöllei, J. Antimicrobial Profile Investigation of Potential Ultrashort Acting Beta-Adrenoceptor Blocking Compounds Containing N-Phenylpiperazine Moiety. *Glob. J. Med. Res. Pharma, Drug Discov. Toxicol. Med.* **2013**,

13, 1–4.

(29) Lima, S.; Milstien, S.; Spiegel, S. A Real-Time High-Throughput Fluorescence Assay for Sphingosine Kinases. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (7), 1525–1530.

(30) Sali, A.; Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234* (3), 779–815.

(31) Wang, J.; Knapp, S.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Elkins, J. M. Crystal Structure of Sphingosine Kinase 1 with PF-543. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (12), 1329–1333.

(32) Gustin, D. J.; Li, Y.; Brown, M. L.; Min, X.; Schmitt, M. J.; Wanska, M.; Wang, X.; Connors, R.; Johnstone, S.; Cardozo, M.; et al. Structure Guided Design of a Series of Sphingosine Kinase (SphK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4608–4616.

(33) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

(34) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; et al. *{Amber 14} OR - University of California, San Francisco*; **2014**.

(35) Gómez Ayala, S.; Stashenko, E.; Palma, A.; Bahsas, A.; Amaro-Luis, J. Sequential Amino-Claisen Rearrangement/Intramolecular 1,3Dipolar -Cycloaddition/Reductive Cleavage Approach to the Stereoselective Synthesis of Cis -4Hydroxy2-Aryl-2,3,4,5-Tetrahydro-1(1 *H*)-Benzazepines. *Synlett* **2006**; Vol. 2006.

(36) Schultz, D. M.; Wolfe, J. P. Synthesis of Polycyclic Nitrogen Heterocycles via Alkene Aminopalladation/Carbopalladation Cascade Reactions. *Org. Lett.* **2010**, *12* (5), 1028–1031.

(37) Tengler, J.; Kapustíková, I.; Stropnický, O.; Mokrý, P.; Oravec, M.; Csöllei, J.; Jampílek, J. Synthesis of New (Arylcarbonyloxy)aminopropanol Derivatives and the Determination of Their Physico-Chemical Properties. *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, *11* (11), 1757–1767.

(38) Plano, D.; G Amin, S.; Sharma, A. The Importance of Sphingosine Kinase (SphK) as a Target in Developing Cancer Therapeutics and Recent Developments in the Synthesis of Novel SphK Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**; Vol. 57.

(39) Landmesser, U.; Hornig, B.; Drexler, H. Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation* **2004**, *109* (21 Suppl 1), II27-33.

(40) Butcher, E. C. Leukocyte-Endothelial Cell Recognition: Three (or More) Steps to Specificity and Diversity. *Cell* **1991**, *67* (6), 1033–1036.

Capítulo 6

Estudios de correlación entre datos experimentales y métodos teóricos

6.1. Introducción

Para mejorar los inhibidores de SphK descriptos en el capítulo 4, particularmente con respecto a la potencia y la selectividad, es necesario continuar explorando el bolsillo de unión de SphK1 con series de moléculas estructuralmente diversas. En el capítulo 4 se describieron dos nuevas series de compuestos que poseen diferentes andamiajes estructurales. Dichos compuestos se obtuvieron a partir de un cribado virtual y entre estos nuevos compuestos, los compuestos **2-4** (Figura 1) mostraron los efectos inhibidores más fuertes en esta serie. Aunque la actividad inhibidora de estos compuestos solo es moderada en comparación con **PF-543**, debe observarse que tales compuestos se obtuvieron a partir de un cribado virtual primario y, por lo tanto, la actividad obtenida es muy prometedora. Está claro que uno de los principales objetivos es aumentar la potencia de estos nuevos compuestos mediante la introducción de cambios estructurales. Sin embargo, la pregunta que surge es: ¿cuáles son los cambios que se deben hacer en estos compuestos y cómo podemos saber antes de su síntesis si estas moléculas van a ser tan activas como esperamos? Esta tarea exige la disponibilidad de enfoques teóricos precisos para evaluar la actividad inhibitoria de nuevos potenciales inhibidores. Un primer paso en este sentido sería probar la eficacia de algunas técnicas existentes en la evaluación de la actividad inhibidora de los nuevos compuestos en SphK1 junto con otros inhibidores ya existentes. Si tenemos éxito en la correlación de las predicciones teóricas en SphK1 con datos experimentales, estas técnicas podrían ser útiles para seleccionar nuevos compuestos generados a partir de tales andamiajes con un efecto inhibidor potencialmente mejorado antes de su síntesis. Además, también se espera que el conocimiento obtenido de la aplicación de tales técnicas brinde información adicional para rediseñar estas nuevas familias de compuestos.

En este capítulo se presentan los resultados de dos modelos teóricos que se basan en diferentes aproximaciones computacionales para predecir el efecto inhibidor de los diferentes compuestos probados contra la Esfingosina Quinasa 1. El sitio activo de SphK1 es un sistema bastante complejo y los ligandos bajo estudio poseen una flexibilidad conformacional significativa; por lo tanto, para este estudio se realizaron simulaciones extendidas y un proceso de agrupamiento (clusterización) adecuado.

6.2. Resultados y discusión

Para este estudio se seleccionaron nueve compuestos: tres inhibidores bien conocidos (**PF-543**, **1v2** y **SKI-II**) para los que se dispone de datos estructurales experimentales (códigos de PDB: 4V24[2], 4L02[3] y 3VZD[4], respectivamente) y seis compuestos informados en el capítulo 4 y en la referencia[1]. Entre estos, se seleccionaron tres compuestos activos (**2-4**) como controles positivos y tres compuestos inactivos (**1**, **5** y **13**) para proporcionar controles negativos (Figura 1). La síntesis y detalles estructurales de estos compuestos se encuentran descriptos en el capítulo 4.

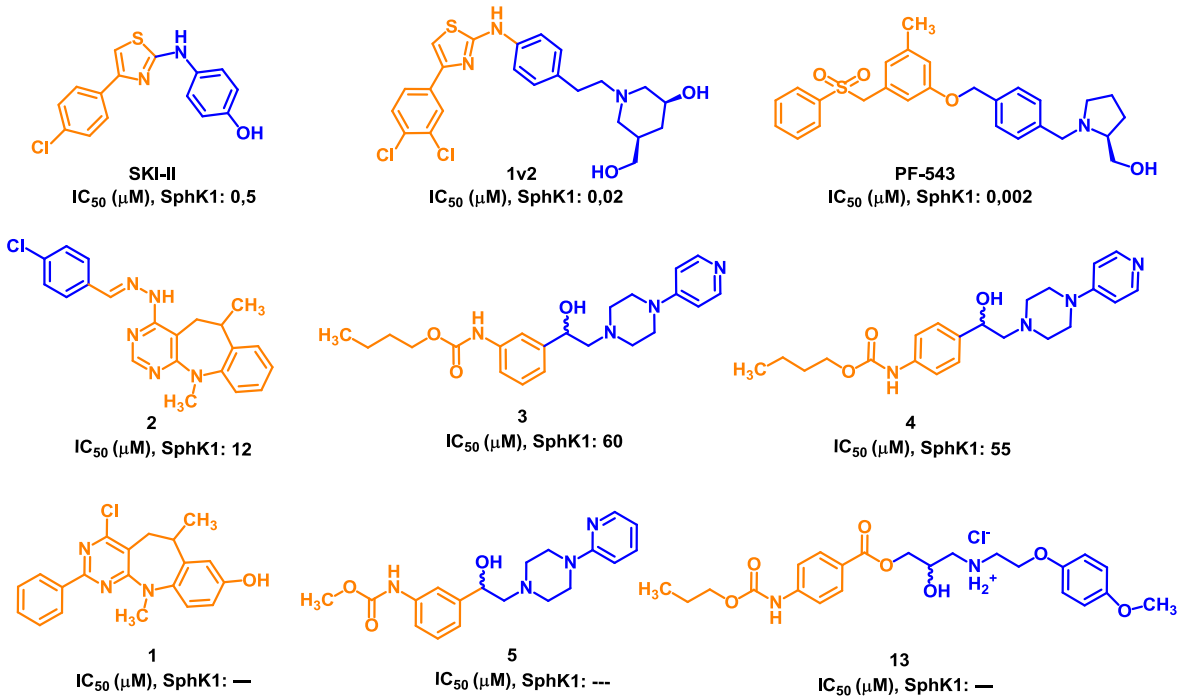


Fig. 1. Características estructurales de los compuestos estudiados en este capítulo. La cabeza polar de cada molécula se ha marcado en color azul y sus respectivas colas hidrofóbicas se muestran en color naranja.

En estudios previos descriptos en bibliografía, se realizaron simulaciones de dinámica molecular en diferentes sistemas biológicos con diferentes grados de complejidad estructural como, por ejemplo, receptor de dopamina D2 (D2DR)[5–9], dihidrofolato reductasa (DHFR)[10,11], acetilcolinesterasa (AChE)[12,13], beta secretasa (BACE 1)[14,15]. En el caso de las simulaciones en el receptor de dopamina D2, se ha demostrado que tres simulaciones de 10 ns cada una son suficientes para obtener resultados satisfactorios[5–9]. Sin embargo, el grado de complejidad estructural y otros factores que tienen una influencia directa en este tipo de simulaciones son diferentes para el sitio activo de la SphK1 con respecto al sitio activo de D2DR. Un estudio comparativo entre los sitios activos de estos dos receptores se resume en la Tabla 1; dicho estudio se llevó a cabo analizando los siguientes aspectos: a) tamaño y profundidad

del sitio activo; b) número de interacciones principales que estabilizan o desestabilizan los complejos ligando-receptor (L-R); c) flexibilidad del sitio activo; d) flexibilidad del ligando; e) tipos de interacciones involucradas en la formación del complejo y f) variabilidad estructural de los diferentes ligandos.

Tabla 1. Parámetros que se consideraron para analizar los sitios activos de los complejos L-R.

	D2	**SphK1**
Área de superficie accesible al solvente (SASA) ($Å^2$)	489	721
Área enterrada ($Å^2$)	428	675
Número de principales interacciones que estabilizan o desestabilizan los complejos	De 3 a 6	Más de 10
Flexibilidad del sitio activo	Marcadamente reducida	Grande
Flexibilidad del ligando	Parcialmente restringido (dos rotaciones)	Muy flexible (más de 10 rotaciones)
Tipos de interacciones involucradas en la formación del complejo	Interacciones iónicas e hidrofóbicas, enlaces puente de hidrógeno	Interacciones iónicas, π-stacking e hidrofóbicas
Variaciones estructurales en los ligandos	Escasa variabilidad	Alta variabilidad

El primer intento fue tratar de encontrar una correlación entre las energías de enlace obtenidas a través del método MM-GBSA (Molecular mechanics/Generalized Born Surface Area) y MM-PBSA (Poisson-Boltzmann Surface Area) con los datos experimentales (IC_{50}) (Figura 2). Desafortunadamente, los resultados al usar GBSA fueron muy pobres. No solo porque el valor de r es muy bajo (r = 0,53), sino también porque estos resultados no permiten diferenciar claramente entre los compuestos más activos con respecto a los menos activos. Por ejemplo, el compuesto **SKI-II** que es muy activo tiene un valor de energía muy alto en relación al resto de la serie. A su vez, los cálculos de PBSA dan un mejor resultado con respecto a GBSA dando un valor de r de 0,69; sin embargo, este resultado es aún insuficiente si se pretende tener un modelo para predecir actividades de compuestos aun no sintetizados. Cabe señalar que la mala performance observada para los métodos GBSA y PBSA podría deberse en parte a la falta de inclusión de entropía. Como se indicó anteriormente, el sitio activo de SphK1 es grande y tiene cierta flexibilidad; además, los ligandos en sí mismos también son bastante flexibles y pueden moverse

bastante antes de unirse en el bolsillo de unión. Por lo tanto, la contribución de entropía podría ser significativa para esta enzima particular y, por lo tanto, al menos en parte, el rendimiento insatisfactorio de estos cálculos podría deberse a que la entropía no fue considerada y no debido al método en sí mismo. Sin embargo, está claro que estas técnicas teóricas sin consideración de entropía no logran mostrar un buen rendimiento en la predicción de la actividad de nuevos compuestos (aún no sintetizados) para este objetivo molecular. Por lo tanto, se decidió probar dos técnicas diferentes que han dado resultados satisfactorios en otros sistemas biológicos. Se utilizaron cálculos aplicando la Teoría cuántica de los átomos en moléculas (QTAIM)[16] y también un estudio de la propensión dinámica de los enlaces puente de hidrógeno de la estructura[17,18].

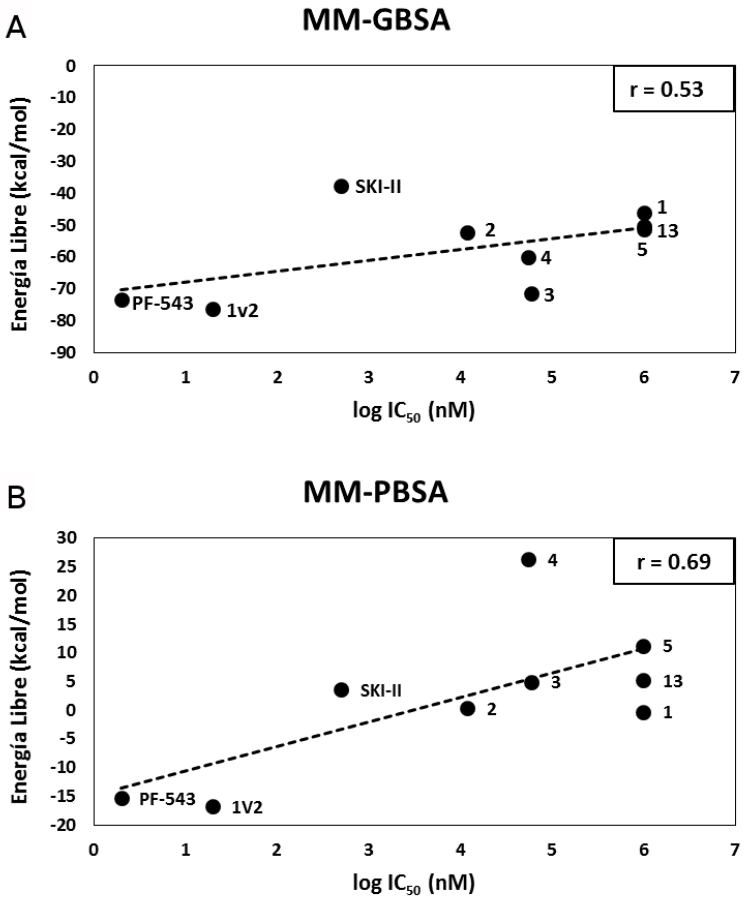


Fig. 2. Correlación obtenida para los diferentes compuestos entre los datos experimentales (IC_{50}) y la energía de unión obtenida por cálculos **(A)** MM-GBSA y **(B)** MM-PBSA.

6.2.1. Cálculos QTAIM

Los estudios que utilizan cálculos QTAIM han sido llevados a cabo por nuestro grupo de investigación con gran éxito en varios sistemas biológicos[6–11,14,15]. De hecho, los cálculos QTAIM ya se han utilizado previamente en complejos de esfingosina quinasa 1 en el capítulo 4, pero en ese caso se utilizaron para otro fin. En ese caso, los cálculos QTAIM se usaron solo para analizar las diferentes interacciones que estabilizaban los complejos de los compuestos más representativos de la serie y compararlos con las interacciones del complejo SphK1/PF-543.

Es importante observar que los cálculos QTAIM se realizan en una geometría determinada, mientras que los enlaces ligando-receptor (L-R) provienen de un conjunto de conformaciones. Por lo tanto, para comprender la actividad de estos compuestos, sería conveniente analizar varias conformaciones de cada complejo L-R. Así, la primera duda que surgió fue cuántas estructuras diferentes para cada complejo serían necesarias considerar. Para resolver este problema, realizamos un proceso de clusterización en las trayectorias de DM. Como análisis preliminares y exploratorios, se realizaron diferentes pruebas con los tres complejos de los que se disponían datos cristalográficos (**SKI-II**, **1v2** y **PF-543**). Los resultados obtenidos para estos cálculos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Diferentes correlaciones entre datos experimentales (IC_{50}) y valores de $\Sigma\rho(r)$(u.a.) (cálculos QTAIM) obtenidos para los compuestos **SKI-II**, **1v2** y **PF-543**.

Ligando	IC_{50} (nM)	log IC_{50}	Estructura Cristalográfica	Más poblado*	50% CLUSTER**	100% CLUSTER***
SKI-II	500	2,72	0,23	0,18	0,43	1,15
1v2	20	1,30	0,50	0,48	0,72	1,57
PF-543	2	0,30	0,41	0,44	1,41	2,12
r =			-0,74	-0,86	-0,95	-0,98

***Más poblado** corresponde a la estructura del líder del cluster más poblado.
****50% cluster** corresponde a las estructuras principales que representan el 50% de la población.
*****100% cluster** corresponde a las 10 estructuras obtenidas a través del proceso de clusterización.

Aunque todas las correlaciones obtenidas entre los datos experimentales y el análisis QTAIM para estos tres compuestos fueron relativamente buenas, se encontraron diferencias significativas según la cantidad de estructuras consideradas. Si solo consideramos las tres estructuras informadas experimentalmente, el resultado obtenido es simplemente aceptable (r = 0,74). Este resultado mejora si tenemos en

cuenta la estructura representativa del clúster más poblado (r = 0,86). A su vez, la correlación mejora significativamente si consideramos el 50% de los estructuras del proceso de clusterización, obteniendo un valor r de 0,95. Es interesante observar que esta correlación es lo suficientemente buena como para considerar que tendría un buen poder predictivo. Si consideramos el 100% del clúster, el valor mejora aún más (r = 0,98). Cabe señalar, sin embargo, que la realización de estos cálculos teniendo en cuenta el 100% del clúster representa una tarea muy exigente en términos de tiempo de cálculo y en el análisis de los resultados. Por lo tanto, se consideró que usar el 50% del clúster era un buen compromiso entre el grado de precisión del cálculo y la demanda computacional. En base a los resultados anteriores, el estudio QTAIM se llevó a cabo considerando el 50% del proceso de agrupamiento.

La Figura 3 muestra que se obtuvo una excelente correlación (r = -0,95) para la serie completa mediante el uso de cálculos QTAIM. Este estudio permite diferenciar perfectamente entre los compuestos más activos (**SKI-II**, **1v2** y **PF-543**), compuestos con actividad moderada (**2**, **3** y **4**) y los compuestos inactivos (**1**, **5** y **13**). Por otro lado, la correlación obtenida es lo suficientemente buena como para esperar un buen poder predictivo para este tipo de ligandos. Es importante señalar que el estudio QTAIM también permite determinar qué partes de las moléculas se deben modificar para aumentar su afinidad por SphK1. Esto puede observarse en la Figura 4. En esta figura, las interacciones producidas por la parte polar de las moléculas (color azul) se han diferenciado de las producidas por la cola hidrófoba de los compuestos (color naranja). Al observar esta figura, es evidente que los compuestos activos tienen interacciones más fuertes que los compuestos menos activos. Es interesante observar que el compuesto **PF-543** tiene interacciones muy fuertes tanto en el área de la cabeza catiónica como en la cola hidrófoba. Esto explica claramente su alta afinidad por el sitio activo de la SphK1 y, por lo tanto, su actividad inhibidora (es el inhibidor más potente informado hasta la fecha). Comparando los valores de $\Sigma\rho(r)$ obtenidos para **1v2** y **PF-543** se puede observar que las interacciones en las zonas de las cabezas catiónicas de estos compuestos son comparables; sin embargo, hay una diferencia notable en las interacciones de la cola hidrofóbica. En este caso, las interacciones observadas para **PF-543** son significativamente más fuertes que las de **1v2** y, por lo tanto, están explicando la actividad más intensa de **PF-543**.

Si comparamos los valores de $\Sigma\rho(r)$ obtenidos para **SKI-II** y **PF-543**, es evidente que tanto la zona de la cabeza catiónica como la cola hidrófoba de **PF-543** establecen un mayor número interacciones y de mayor fortaleza que las obtenidas para **SKI-II**, que está en total acuerdo con los datos experimentales. Por otro lado, los compuestos activos informados previamente en el capítulo 4 (moléculas **2-4**) presentan interacciones significativamente más débiles en ambas porciones del receptor, lo que

indica que es necesario introducir cambios estructurales en ambas partes del ligando para obtener una mayor actividad inhibidora. Una vez más, estos resultados son respaldados por los datos experimentales.

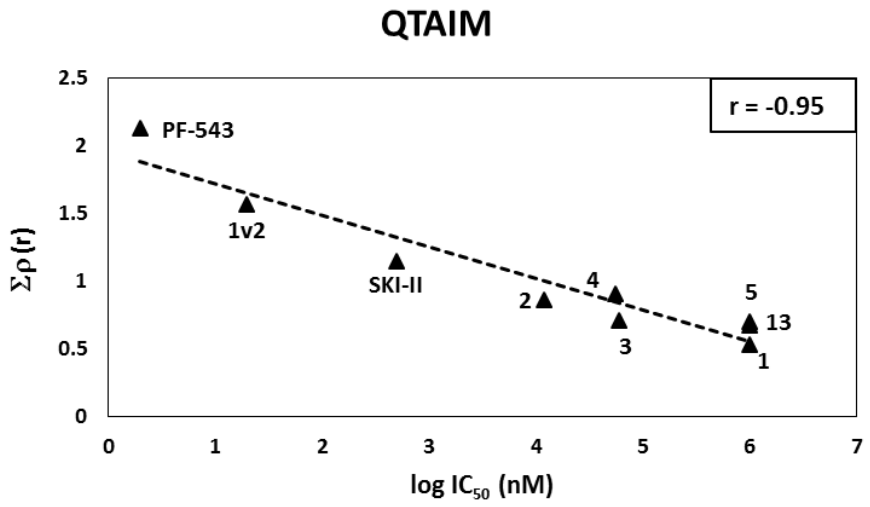


Fig. 3. Correlación obtenida mediante el uso de cálculos QTAIM para toda la serie.

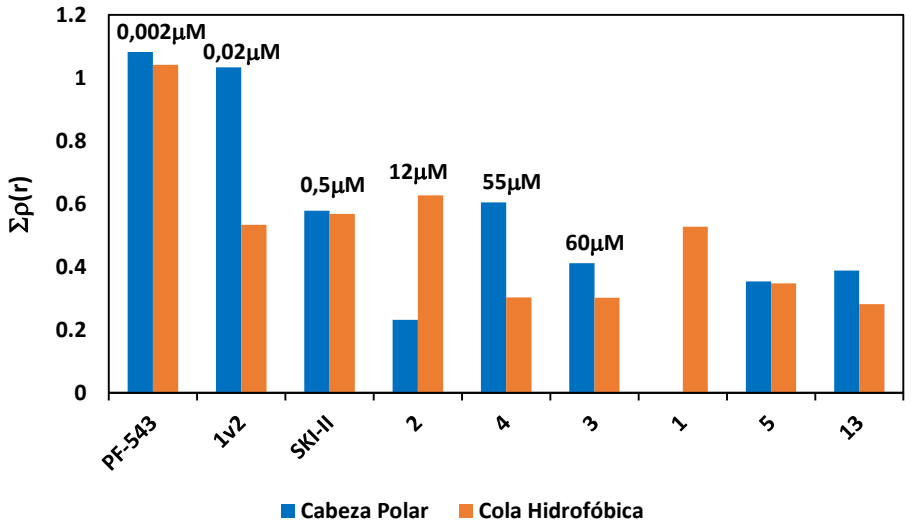


Fig. 4. Valores de densidad de carga para las interacciones totales de la cabeza polar (barras azules) y la porción hidrófoba (barras naranjas) para **PF-543**, **1v2**, **SKI-II** (compuestos más activos), compuestos **2-4** (moléculas menos activas) y compuestos **1**, **5** y **13** (moléculas inactivas). Los contactos repulsivos cortos C-H•••H-C no se incluyeron.

Considerando el compuesto más activo reportado por nuestro grupo (compuesto **2**), se puede ver que las interacciones en la cola hidrofóbica de este compuesto son más que aceptables. De hecho, estas interacciones son mayores que las encontradas para **1v2** y **SKI-II**. Sin embargo, las interacciones obtenidas para la cabeza polar del compuesto **2** son

marcadamente más débiles que las encontradas para **1v2** y **SKI-II** y esto explicarían el menor efecto inhibidor del compuesto **2** con respecto a **1v2** y **SKI-II**. Por el contrario, los resultados obtenidos para los compuestos **3** y **4** sugieren que las interacciones que se deben aumentar son las de la porción hidrófoba (zona naranja) (Figuras 4 y 5).

Con respecto a los resultados obtenidos para los compuestos inactivos (**1**, **5** y **13**), es posible observar que, en general, las interacciones de estos compuestos son las más débiles. El caso del compuesto **1** es muy particular, porque adopta una disposición espacial diferente del resto de los compuestos y solo puede establecer interacciones con la zona hidrofóbica del sitio activo (zona naranja en la Figura 5). Este comportamiento diferente podría explicar su falta de actividad.

Si comparamos las interacciones obtenidas para los compuestos **5** y **13** con los compuestos más activos (**SKI-II**, **1v2** y **PF-543**), las diferencias son muy marcadas. Sin embargo, esta diferencia es solo sutil cuando las interacciones se comparan con las del compuesto **3**. De hecho, aunque las interacciones del compuesto **3** son ligeramente mayores, esta diferencia es muy pequeña. Existen al menos dos explicaciones posibles para esta situación: a) se debe tener en cuenta que aunque el compuesto **3** se considera activo, su actividad podría considerarse casi marginal (IC_{50} = 60 μM), b) debe observarse que los compuestos **3**, **4**, **5** y **13** poseen un centro quiral y, por lo tanto, son enantioméricos con la posibilidad de dos isómeros (R y S). Sin embargo, no se realizó una resolución enantiomérica para los ensayos biológicos y por lo tanto, se utilizó la mezcla racémica en cada caso. Para el estudio de modelado molecular, solo se evaluó un isómero de cada compuesto en las simulaciones de DM y cálculos posteriores. Para elegir las formas isoméricas de cada compuesto, se consideraron simulaciones exploratorias preliminares y especialmente realizadas que determinaron la forma preferida espacialmente para estos compuestos. El estudio de docking preliminar y exploratorio y las simulaciones con tiempos más cortos de DM (tres series de 5 ns cada una) indican que el ordenamiento espacial adoptado por las formas R proporciona la orientación espacial más adecuada de las moléculas para interactuar en el sitio activo de SphK1. Por lo tanto, sobre la base de tales resultados, se eligieron las formas R para las simulaciones. Esta situación podría introducir algo de "ruido" que podría afectar estos resultados y que no es posible evaluar tan satisfactoriamente a través de este tipo de simulaciones. A pesar de esto, es evidente que el análisis QTAIM ofrece una excelente correlación con los datos experimentales. Por otro lado estos estudios brindan adicionalmente otra información que es extremadamente útil, ya que indica qué parte de la molécula debe modificarse para aumentar su actividad inhibidora frente a SphK1.

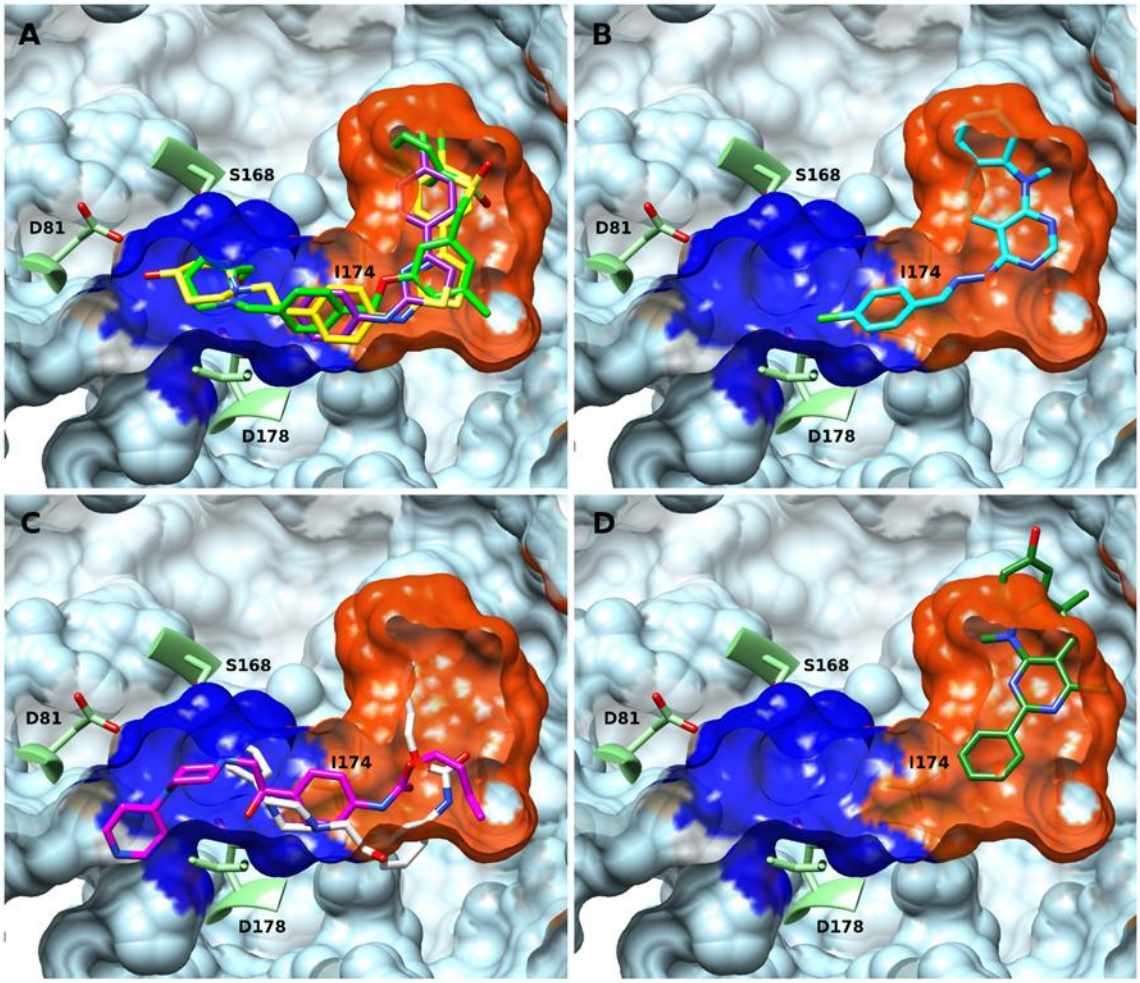


Fig. 5. Vista espacial de los diferentes ligandos unidos en el bolsillo de unión de SphK1. Las zonas azul y naranja representan las porciones catiónicas e hidrofóbicas del sitio activo, respectivamente. **(A) PF-543** (verde claro), **1v2** (amarillo) y **SKI-II** (violeta) superpuestos. **(B)** Compuesto **2** (cian). **(C)** Compuesto **3** (blanco) y **4** (magenta) superpuestos. **(D)** Compuesto **1** (verde oscuro). Algunos de los principales aminoácidos implicados en la formación de los complejos L-R también se muestran en esta figura. Las estructuras se tomaron de un proceso de clusterización en el que se consideraron los últimos 45 nanosegundos de cada una de las tres simulaciones.

6.2.2. Estudio de propensión dinámica

Como una perspectiva complementaria, se estudió la propensión dinámica de los enlaces puente de hidrógeno de la cadena principal de la proteína SphK1 para determinar sus propiedades de unión. Este enfoque ha sido impulsado por la observación de que ciertos enlaces puente de hidrógeno del esqueleto de la proteína (BHB, backbone hydrogen bonds), principalmente los que pertenecen a sitios de unión en varias proteínas apo, exhiben una propensión dinámica en simulaciones que difieren notablemente en su valor de estado (es decir, formado/no formado) en la estructura del PDB reportada. Este hecho los hace atractivos como

objetivos para la estabilización local de proteínas tras la unión del ligando[17,18]. El estudio de propensión dinámica de BHBs representa un método simple que ha sido explicado en detalle en bibliografia[17,18]. Específicamente, para cada BHB de la proteína apo se calcula un valor D, correspondiente a la diferencia entre la propensión durante de dinámica (fracción de tiempo del enlace formado durante una trayectoria de dinámica molecular) y su correspondiente estado de la estructura PDB reportada. Al analizar los valores D, generalmente se encuentra que la mayoría de los BHB del PDB son estables durante la dinámica (valor de D bajos). Sin embargo, ciertos BHB exhiben valores D grandes, que corresponden a interacciones que están presentes en el PDB y tienden a interrumpirse durante (o parte de) la dinámica o, con menor frecuencia, a interacciones que, aunque están ausentes en el PDB, se forman persistentemente durante la dinámica. Entonces, si el valor absoluto de D para un BHB dado es superior a ½, lo llamamos C-HB (lo que refleja el hecho de que dicho BHB tiende a "cambiar su estado" de formado a mayormente alterado o de no-formado a formado en su mayoría entre la estructura PDB y la dinámica[17,18]). Además, los estudios sobre la ubicación de tales C-HBs para una serie de proteínas han detectado un claro enriquecimiento de los mismos en sitios de unión. Por otro lado, estudios previos realizados por un grupo de investigación de la UNS sobre una serie de complejos de proteínas-proteinas o ligandos-proteínas mostraron que la mayoría de los C-HB están fuertemente estabilizados en la forma acomplejada en comparación con la forma apo, lo que indica que la estabilización de los C-HB proporciona una fuerza motriz para la unión[18]. Los C-HBs incluyen regiones de la proteína cuya estabilización depende del establecimiento de un contexto local adecuado (generalmente con eliminación de agua) proporcionado por el ligando al unirse. De hecho, la estabilización de C-HBs se ha demostrado de forma cuantitativa para una serie de complejos proteína-proteína y proteína-ligando, obteniendo buenas correlaciones con los valores de afinidad experimentales[18]. Es interesante señalar que este método proporciona un enfoque complementario ya que no hace énfasis en las interacciones directas proteína-ligando, sino más bien en la estabilización local del sitio de unión a la proteína diana tras la unión del ligando.

Deberíamos observar que en este estudio no ha sido posible determinar los C-HB exactamente de la misma manera que lo reportados en bibliografía[17,18] ya que se carece de una estructura apo de SphK1 comparable. De hecho, no existe ninguna estructura SphK1 obtenida experimentalmente (RMN o rayos X) exactamente en las mismas condiciones que para los diferentes complejos informados y utilizados en el presente estudio (cristalizados con ADP y Mg^{2+}). Por lo tanto, generamos una estructura apo quitando el inhibidor **SKI-II** del complejo y determinamos los BHBs que pertenecen al sitio de unión como aquella cuya distancia (medida desde N de la amida o el O del carbonilo) a

cualquier átomo pesado del **SKI-II** en el complejo (PDB: 3VZD) es menor que 6 Å. De este modo, las propensiones dinámicas de dichos BHB se calcularon sobre un total de 27.000 configuraciones de DM (tres réplicas de 45 ns). Entonces todos aquellos BHB que se encuentran formados en menos de la mitad de las configuraciones analizadas (es decir, valor D > 0,5) serán C-HBs. La Tabla 3 muestra los C-HB considerados, junto con sus valores D correspondientes. Es importante mencionar que el BHB 303-299 se incluyó aunque no cumple estrictamente con el valor de corte establecido, ya que en dos de las réplicas su propensión dinámica es menor a 0,5, mientras que en el otro es mayor.

Tabla 3. Valores D para C-HBs que pertenecen al sitio de unión de SphK1.

C-HBs		**SphK1: forma APO**
nRES	**nRES**	**Valores D**
178	174	0,841
181	177	0,561
272	269	0,762
303	299	0,391
302	298	0,546

Posteriormente, se evaluaron las propensiones dinámicas para C-HBs en los complejos entre SphK1 y los compuestos más activos: **SKI-II**, **1v2** y **PF-543**. La Tabla 4 muestra los valores de DM (valores promedio de D), es decir, para cada C-HBs calculamos los valores D y, luego promediando tales cantidades, para obtener el valor en cada DM. Esta tabla muestra una excelente correlación entre los datos de afinidad de unión experimental y los valores de DM para estos tres compuestos (r = 0,97). Las propensiones dinámicas se evaluaron en el mismo período de tiempo que los cálculos QTAIM.

La Figura 6 muestra también una excelente correlación para la serie completa de compuestos (r = 0,92). Este estudio, como el estudio QTAIM, permite diferenciar los compuestos más activos (**PF-543**, **1v2** y **SKI-II**) de compuestos con actividad moderada (**2-4**) y compuestos inactivos (**1**, **5** y **13**). Sin embargo, es importante señalar que los tiempos requeridos para los cálculos computacionales y para el análisis de los resultados son significativamente inferiores en comparación con los requeridos para el análisis QTAIM y, por lo tanto, esta técnica podría ser muy adecuada para un análisis exploratorio de esta clase de compuestos.

Tabla 4. Correlación entre los datos experimentales (IC_{50}) y los valores de DM obtenidos para los compuestos **SKI-II**, **1v2** y **PF-543**.

Compuesto	IC_{50} (nM)	log (IC_{50})	DM (5-50 ns)
SKI-II	500	2,70	0,53
1v2	20	1,30	0,47
PF-543	2	0,30	0,37
r =			**0,97**

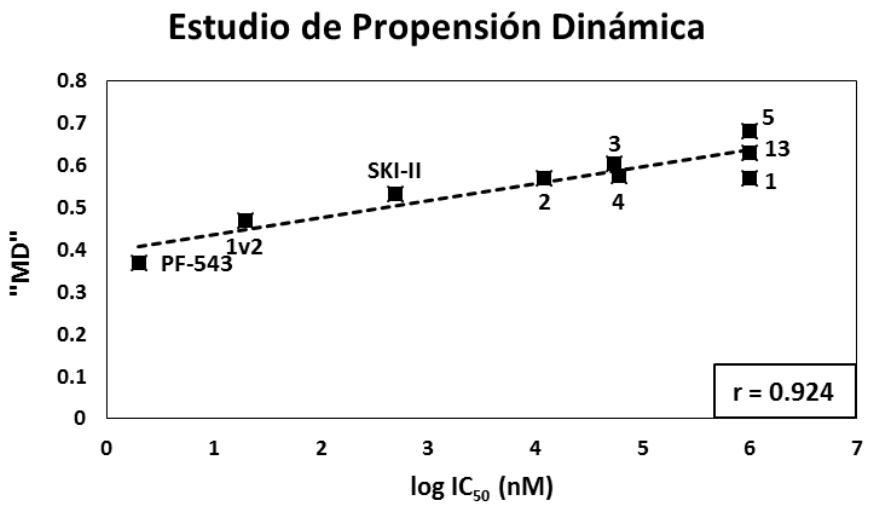


Fig. 6. Correlación entre el valor de DM y los datos experimentales (IC_{50}) para toda la serie.

6.3. Conclusiones

Poder predecir la actividad inhibidora de nuevos compuestos antes de ser sintetizado es ciertamente un objetivo altamente deseable. Para el caso específico de los complejos de SphK1, presentamos en este capítulo dos métodos teóricos que se basan en diferentes bases computacionales y que en ambos casos producen excelentes correlaciones con los datos experimentales. A partir de estos resultados, es razonable esperar que tales métodos también puedan presentar capacidad predictiva para otros compuestos estructuralmente relacionados que aún no se han sintetizado. En el caso del análisis de la propensión a la dinámica de los enlaces puente de hidrógeno, cabe destacar que se trata de una metodología bastante simple, con bajos requerimientos computacionales y arroja resultados en excelente acuerdo con los datos experimentales. Con

respecto al estudio QTAIM, mostró resultados excelentes brindando una descripción muy precisa de las interacciones moleculares.

Comparando las dos técnicas utilizadas aquí, es evidente que los cálculos QTAIM son mucho más exigentes a nivel de cálculo (requieren mayor tiempo computacional). Con respecto al tiempo de CPU, la relación entre el análisis de propensión dinámica de enlace puente de hidrógeno y los cálculos QTAIM es de 1 hora frente a 10 hs. Pero también el análisis QTAIM requiere un tiempo más largo en la preparación del sistema modelo para estudiar (antes de proceder al cálculo) y especialmente en el análisis final de las interacciones (posterior al cálculo). Ambos procesos son mucho más complejos y tediosos que los requeridos para el análisis de propensión dinámica de enlace puente de hidrógeno. Sin embargo, este mayor esfuerzo computacional se justifica plenamente porque el estudio QTAIM, además de brindar una excelente correlación con los datos experimentales, también brinda información valiosa sobre qué partes o grupos funcionales de los diferentes ligandos son los que deben ser reemplazados para mejorar las interacciones y de este modo aumentar la afinidad por SphK1. Posiblemente, la principal limitación en el uso de cálculos QTAIM para el análisis de las interacciones L-R, es que es necesario tener las geometrías correctas para estos complejos. Hay que tener en cuenta que el estudio QTAIM implica cálculos estáticos que se están utilizando para evaluar un proceso dinámico. Por lo tanto, tener muchas geometrías (o al menos las más representativas) de cada complejo es fundamental para obtener resultados satisfactorios. En este estudio, para garantizar esta información, se llevaron a cabo extensas simulaciones de DM y se realizó un proceso de clusterización para los diferentes complejos estudiados. Cabe señalar que el sitio activo de SphK1 es un sistema bastante complejo desde el punto de vista estructural; a su vez, la flexibilidad conformacional de los ligandos y la variedad estructural de los compuestos imponen un alto grado de dificultad para el estudio de modelado molecular de esta enzima. Esto requiere realizar simulaciones extendidas y agrupaciones adecuadas si pretendemos obtener resultados satisfactorios.

En resumen, se estudiaron dos enfoques teóricos diferentes que muestran excelentes correlaciones con los datos experimentales y que pueden ser muy útiles para predecir el efecto inhibidor de nuevos compuestos antes de que se sinteticen.

6.4. Referencias

(1) Vettorazzi, M.; Angelina, E.; Lima, S.; Gonec, T.; Otevrel, J.; Marvanova, P.; Padrtova, T.; Mokry, P.; Bobal, P.; Acosta, L. M.; et al. An Integrative Study to Identify Novel Scaffolds for Sphingosine Kinase 1 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 461–481.

(2) Wang, J.; Knapp, S.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Elkins, J. M. Crystal Structure of Sphingosine Kinase 1 with PF-543. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (12), 1329–1333.

(3) Gustin, D. J.; Li, Y.; Brown, M. L.; Min, X.; Schmitt, M. J.; Wanska, M.; Wang, X.; Connors, R.; Johnstone, S.; Cardozo, M.; et al. Structure Guided Design of a Series of Sphingosine Kinase (SphK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4608–4616.

(4) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.-H.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; et al. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(5) Luchi, A. M.; Angelina, E. L.; Andujar, S. A.; Enriz, R. D.; Peruchena, N. M. Halogen Bonding in Biological Context: A Computational Study of D2 Dopamine Receptor. *J. Phys. Org. Chem.* **2016**, *29* (11), 645–655.

(6) Parraga, J.; Andujar, S. A.; Rojas, S.; Gutierrez, L. J.; El Aouad, N.; Sanz, M. J.; Enriz, R. D.; Cabedo, N.; Cortes, D. Dopaminergic Isoquinolines with Hexahydrocyclopenta[ij]-Isoquinolines as D2-like Selective Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 27–42.

(7) Parraga, J.; Cabedo, N.; Andujar, S.; Piqueras, L.; Moreno, L.; Galan, A.; Angelina, E.; Enriz, R. D.; Ivorra, M. D.; Sanz, M. J.; et al. 2,3,9- and 2,3,11-Trisubstituted Tetrahydroprotoberberines as D2 Dopaminergic Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 150–166.

(8) Andujar, S. a; Tosso, R. D.; Suvire, F. D.; Angelina, E.; Peruchena, N.; Cabedo, N.; Cortes, D.; Enriz, R. D. Searching The "biologically Relevant"conformation of Dopamine: A Computational Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 99–112.

(9) Angelina, E. L.; Andujar, S. A.; Tosso, R. D.; Enriz, R. D.; Peruchena, N. M. Non-Covalent Interactions in Receptor–ligand Complexes. A Study Based on the Electron Charge Density. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27* (2), 128–134.

(10) Tosso, R. D.; Andujar, S. A.; Gutierrez, L.; Angelina, E.; Rodr??guez, R.; Nogueras, M.; Baldoni, H.; Suvire, F. D.; Cobo, J.; Enriz, R. D. Molecular Modeling Study of Dihydrofolate Reductase Inhibitors. Molecular Dynamics Simulations, Quantum Mechanical Calculations, and Experimental Corroboration. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 2018–2032.

(11) Tosso, R.; Vettorazzi, M.; A. Andujar, S.; J. Gutierrez, L.; C. Garro, J.; Angelina, E.; Rodriguez, R.; Suvire, F.; Nogueras, M.; Cobo, J.; et al. The Electronic Density Obtained from a QTAIM Analysis Used as Molecular Descriptor. A Study Performed in a New Series of DHFR Inhibitors; *J. Molec. Struc.* **2016**; Vol. 1134.

(12) Ortiz, J. E.; Garro, A.; Pigni, N. B.; Aguero, M. B.; Roitman, G.; Slanis, A.; Enriz, R. D.; Feresin, G. E.; Bastida, J.; Tapia, A. Cholinesterase-Inhibitory Effect and in Silico Analysis of Alkaloids from Bulbs of Hieronymiella Species. *Phytomedicine* **2018**, *39*, 66–74.

(13) Siano, A.; Garibotto, F. F.; Andujar, S. A.; Baldoni, H. A.; Tonarelli, G. G.; Enriz, R. D. Molecular Design and Synthesis of Novel Peptides from Amphibians Skin Acting as Inhibitors of Cholinesterase Enzymes. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (3), 236–244.

(14) Gutierrez, L. J.; Angelina, E.; Gyebrovszki, A.; Fulop, L.; Peruchena, N.; Baldoni, H. A.; Penke, B.; Enriz, R. D. New Small-Size Peptides Modulators of the Exosite of BACE1 Obtained from a Structure-Based Design. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *35* (2), 413–426.

(15) Gutierrez, L. J.; Parravicini, O.; Sanchez, E.; Rodriguez, R.; Cobo, J.; Enriz, R. D. New Substituted Aminopyrimidine Derivatives as BACE1 Inhibitors: In Silico Design, Synthesis and Biological Assays. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**, 1–18.

(16) Bader, R. F. W. Atoms in Molecules. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18* (1), 9–15.

(17) Menendez, C. A.; Accordino, S. R.; Gerbino, D. C.; Appignanesi, G. A. "Chameleonic" backbone Hydrogen Bonds in Protein Binding and as Drug Targets. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter* **2015**, *38* (10), 107.

(18) Menendez, C. A.; Accordino, S. R.; Gerbino, D. C.; Appignanesi, G. A. Hydrogen Bond Dynamic Propensity Studies for Protein Binding and Drug Design. *PLoS One* **2016**, *11* (10), e0165767.

Capítulo 7

Diseño de nuevos inhibidores de SphK

7.1. Introducción

Tal como fuera señalado en el primer capítulo de esta tesis, uno de los principales objetivos era obtener nuevos inhibidores de SphK1. Esta sección se centra en la búsqueda de nuevos inhibidores para SphK, tomando como punto de partida la estructura de inhibidores ampliamente conocidos en la bibliografía, como son el caso de **SKI-II**[1–3], **1v2**[4] y **PF-543**[5,6], descriptos ampliamente en los capítulos anteriores.

A partir de la estructura química de **SKI-II**, se realizaron modificaciones estructurales con el objetivo de obtener nuevos inhibidores de la enzima. Luego de sintetizar y llevar a cabo los bioensayos correspondientes, se realizaron diferentes estudios moleculares, entre ellos docking, dinámica molecular, análisis de descomposición por residuo y QTAIM[7] para intentar explicar el mecanismo de acción de estos nuevos compuestos en la enzima. Con los datos obtenidos, se diseñó una nueva serie de compuestos de un tamaño molecular mayor tomando como compuesto de referencia a **PF-543**, pero conservando la porción polar y no polar característica de todos los inhibidores de esta enzima. Los resultados se muestran a lo largo de esta capitulo.

7.2. Resultados y discusión

7.2.1. Modificación estructural de SKI-II

En la primera etapa de este estudio se realizó una pequeña modificación estructural al inhibidor **SKI-II**, reemplazando solamente el anillo tiazol por un anillo pirimidina, obteniendo de este modo el compuesto **19a** (Figura 1). Considerando que se sabe que el grupo OH de estos compuestos juega un rol importante en lo que respecta a las interacciones que estabilizan sus complejos moleculares a través de enlaces puente de hidrogeno[8], se sintetizo también el compuesto **20a** en el cual se reemplazó el grupo -OH por un sustituyente $-NH_2$. Está claro que ambos sustituyentes tienen la capacidad de dar uniones puente de hidrógeno como donores de hidrógeno (Tabla 1).

La etapa siguiente consistió en medir las actividades inhibidoras de los compuestos **19a** y **20a**. Utilizando este mismo método de medición se determinó el valor de IC_{50} para **PF-543**. Si bien no se evaluaron los compuestos **SKI-II** y **1v2**, considerando que la técnica utilizada no es de máxima precisión, se estima que los valores son algo superiores a los informados previamente en diferentes publicaciones. Por lo tanto, lo mejor es comparar los valores medidos por la misma técnica, y por eso se tomó **PF-543** como el compuesto de referencia.

Tal como puede apreciarse en la Tabla 1, si bien **19a** y **20a** muestran una significativa actividad inhibidora de la enzima, sus efectos son visiblemente menores a los de su predecesor (**SKI-II**).

Con el propósito de obtener compuestos más activos, se realizaron una serie de modificaciones estructurales en el compuesto **19a** al cual se le introdujeron cambios, tanto en la porción polar de la molécula (color rosa) como así también en la parte destinada a dar interacciones hidrofóbicas (color rojo) (Tabla 1). De esta manera se obtuvieron los compuestos **21a**, **22a**, **23a** y **24a** en los que se les modificó la porción polar.

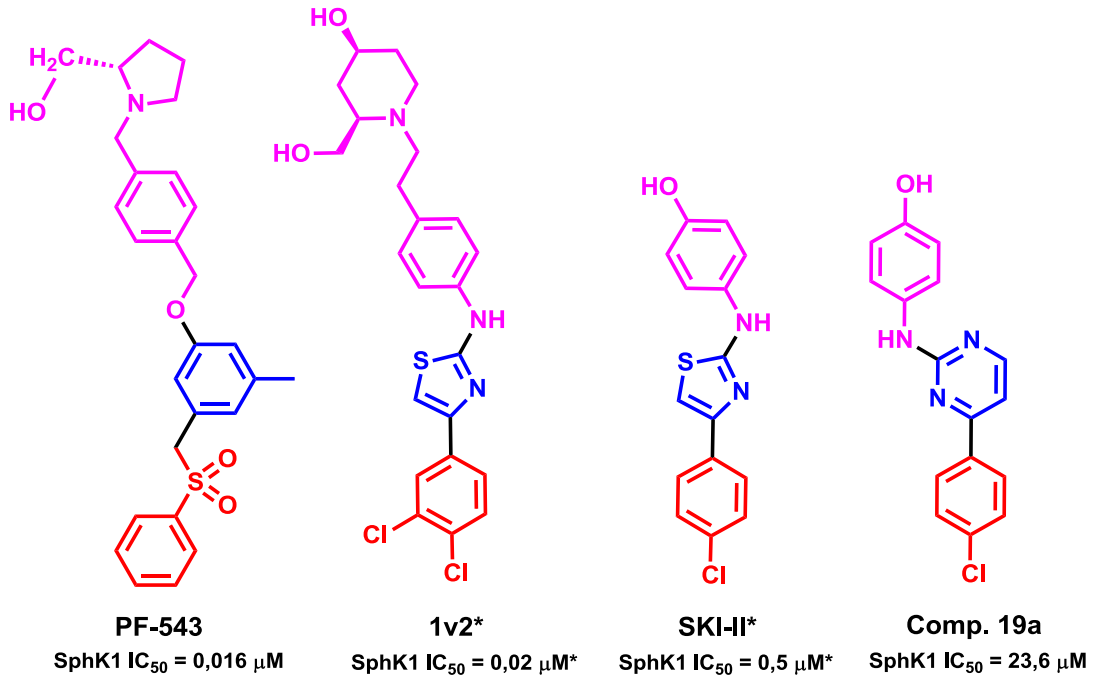


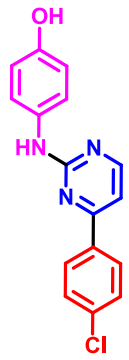
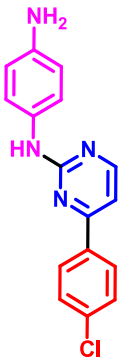
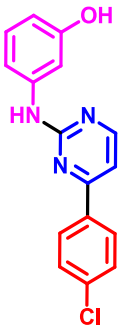
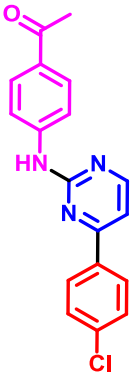
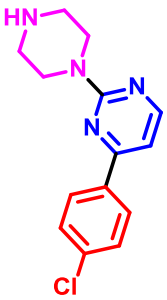
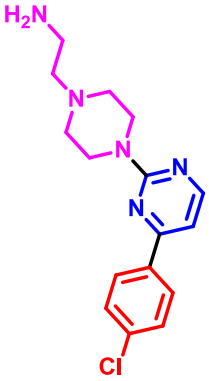
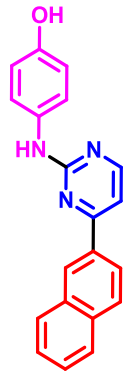
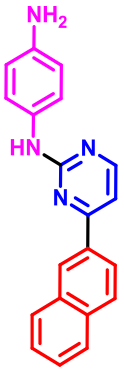
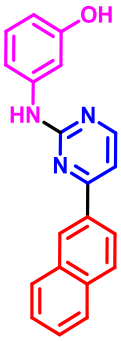
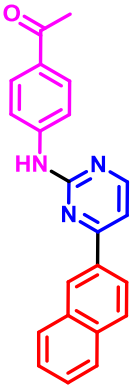
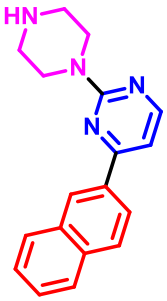
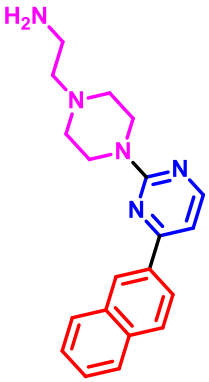
Fig. 1. Estructura química de los principales inhibidores de SphK1 (**PF-543**, **1v2** y **SKI-II**) y el compuesto **19a** diseñado reemplazando el anillo tiazol de **SKI-II** por un anillo de pirimidina (color azul) con sus respectivos valores de IC_{50}. Los compuestos marcados con asterico (*) poseen los valores de IC_{50} medidos con tecnicas diferentes a la realizada en este trabajo, por lo cual se espera que estos valores sean un poco mayores utilizando la técnica descripta por Lima et al.[9] valorada en esta tesis.

Previamente Gustin et. al. (2013)[4] ha reportado compuestos en los cuales la porción hidrofóbica corresponde a un doble anillo bencénico. Estos compuesto presentan valores de IC_{50} entre 1-2 μM, por lo cual se intentó reproducir la porción no polar de estas moléculas, para comparar el cambio de la actividad entre los distintos compuestos. Así se obtuvieron los compuestos **19b**, **20b**, **21b**, **22b**, **23b**, **24b** (Tabla 1).

Desafortunadamente ninguno de estos nuevos compuestos mostró actividades inhibitorias significativas contra SphK1 o al menos que sean mejores a los mostrados por sus predecesores, los compuestos **19a** y **20a**. Si bien estos resultados fueron un tanto decepcionantes, por otro lado

mostraron claramente que pequeños cambios estructurales en estas moléculas producen grandes modificaciones en lo que respecta a la actividad inhibitoria.

Tabla 1. Características estructurales de los nuevos compuestos sintetizados. Se muestran los valores obtenidos para aquellos compuestos con IC_{50} < 200 μM.

19a	20a	21a	22a	23a	24a
					
IC_{50} SphK1 = 23,6 μM	IC_{50} SphK1 = 10,5 μM				
19b	**20b**	**21b**	**22b**	**23b**	**24b**
					

7.2.2. Diseño racional de nuevos compuestos

En función de estos resultados negativos, a partir de esta etapa del estudio, la búsqueda de nuevos inhibidores se realizó de un modo más racional y basándose en datos estructurales.

Para obtener información sobre el comportamiento de estos compuestos a nivel sub-molecular, se realizó un estudio de docking molecular[10,11]. Mediante estos estudios se pudo observar que mientras el compuesto **SKI-II** solo adopta una conformación altamente preferida que corresponde a una forma similar al de la estructura cristalina (Figura 2a), los compuestos **19a** y **20a** pueden adoptar dos conformaciones diferentes. En una de ellas, si bien las porciones polares e hidrofóbicas de los

compuestos están bien orientadas, estos ordenamientos espaciales están ligeramente corridos hacia el centro del bolsillo de unión, si se los compara con la forma adoptada por **SKI-II** (ver Figura 2b). Por el contrario, la otra conformación acomoda la porción polar e hidrofóbica de los ligandos en forma invertida con respecto a **SKI-II** (Figura 2c). Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, porque los compuestos **19a** y **20a** presentan una menor afinidad por SphK1 con respecto a **SKI-II**. De todos modos hay que ser un tanto cautelosos con esto, ya que es bien sabido que los resultados de docking deben ser considerados como datos exploratorios y preliminares y no definitivos; por lo tanto en esta etapa de nuestro estudio se decidió hacer análisis de modelado molecular un poco más rigurosos. Así completamos el estudio de modelado mediante simulaciones de dinámica molecular (análisis por residuo mediante cálculos MM-GBSA[12]) y también cálculos QTAIM para una evaluación más exhaustiva de las interacciones moleculares de los diferentes complejos moleculares.

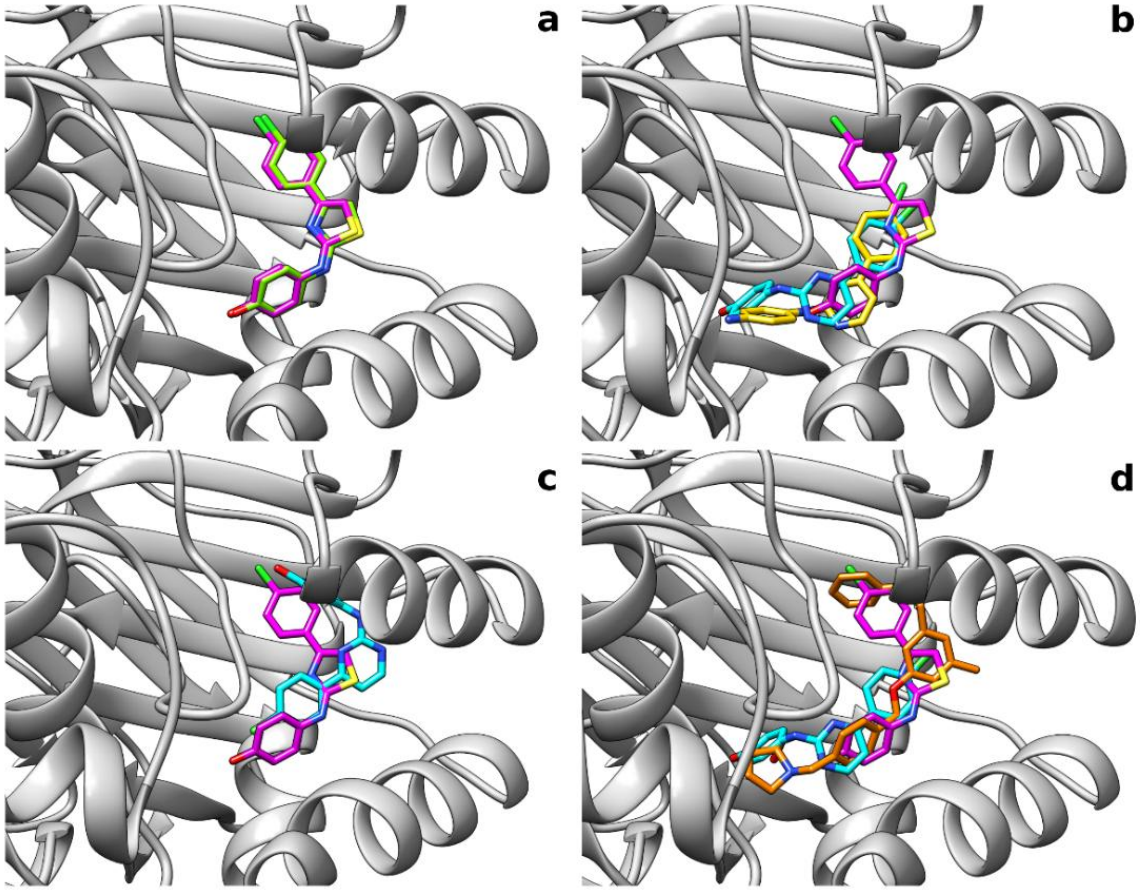


Fig. 2. (a) Estructura cristalina de **SKI-II** (rosa) superpuesta a **SKI-II** obtenido para un total de 200 conformaciones calculadas mediantes técnicas de docking molecular (verde). **(b)** Estructura cristalina de **SKI-II** (rosa) superpuesta con los compuestos **19a** (cian) y **20a** (amarillo) en la conformación similar a la obtenida por **SKI-II**. **(c)** Estructura cristalina **de SKI-II** (rosa) superpuesta con el compuesto **19a** (cian) en una conformación invertida con respecto a la obtenida para **SKI-II**. **(d)** Estructura cristalina de **SKI-II** (rosa) junto al compuesto **19a** (cian), superpuesto al inhibidor **PF-543** (naranja).

Para este estudio decidimos tomar como compuesto de referencia a otro conocido inhibidor de SphK1, el compuesto **PF-543** que es el inhibidor más potente conocido hasta la fecha. En este caso, además de los estudios de docking, también se realizaron simulaciones de dinámica molecular y un análisis por residuo obtenido mediante cálculos MM-GBSA.

El estudio de docking muestra claramente que el compuesto **PF-543** se acomoda a lo largo del bolsillo del sitio de unión en una conformación muy similar a la que muestra su estructura cristalina[5] (Figura 2d). Pero también resulta interesante notar que si se superponen las estructuras de los compuestos **19a** y **SKI-II**, entre los dos ocupan aproximadamente el mismo sitio que **PF-543** (Figura 2d). En función de estos resultados se pensó que aumentando un poco la longitud de la estructura de **19a** tal vez se podría aumentar su afinidad con SphK1. A partir de esto, se trató de alargar la estructura del compuesto **19a** mediante la incorporación de una porción polar más grande dando lugar al compuesto **25** (Figura 3). En este compuesto también se introdujo un reemplazo isostérico cambiando el grupo NH por O en la cadena conectora, con el fin de otorgarle una mayor flexibilidad a la molécula.

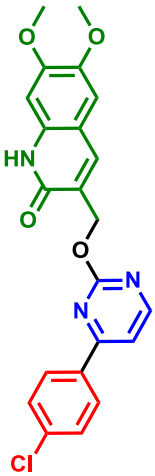


Fig. 3. Estructura química del compuesto **25**.

Antes de sintetizar el compuesto **25**, se le realizó un estudio de docking, simulaciones de dinámica molecular y cálculos QTAIM, para evaluar su comportamiento y compararlo con el de los compuestos anteriormente valorados, y así determinar si realmente se justificaba su síntesis. Estos resultados se muestran en las Figuras 4 y 5. En la primera de ellas se puede ver una superposición espacial del compuesto **PF-543** con **25** en la cual se aprecia que ambas moléculas se acomodan espacialmente en forma similar. También se observan las interacciones puente de hidrogeno con I174 y G342 que estabilizan la unión del ligando dentro del bolsillo. Esto se condice con la Figura 5, donde se ve claramente la importancia de estas dos interacciones con energías cercanas a -8 y -4 Kcal/mol, respectivamente.

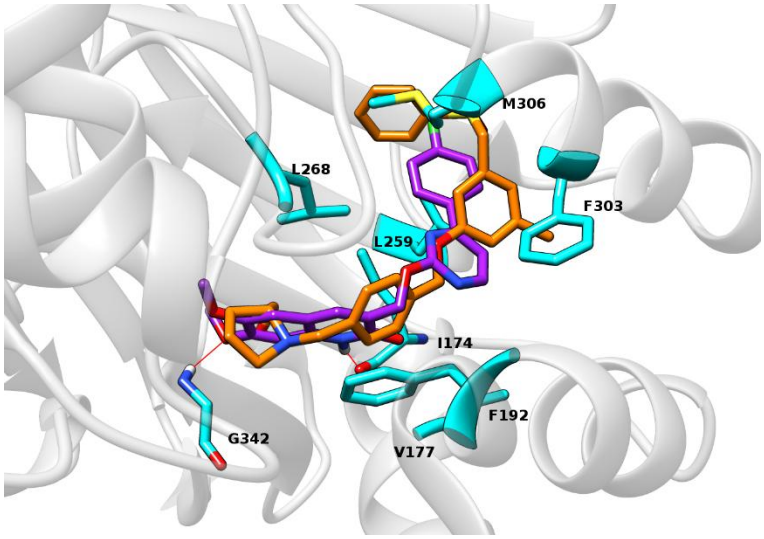


Fig. 4. Vista espacial de **PF-543** (naranja) y el compuesto **25** (violeta) superpuesto en el bolsillo de unión de SphK1. Se remarcan los aminoácidos más importantes dentro del sitio. La líneas rojas representan los enlaces puente de hidrogeno que establece el compuesto **25** con diferentes residuos.

En las Figuras 5a y 5b se puede observar el análisis por residuo obtenido para los compuestos **25**, **SKI-II** y **PF-543** mediante las simulaciones de dinámica molecular. Los compuestos **25** y **SKI-II** tienen interacciones similares e incluso en algunos casos las interacciones de **25** son más fuertes como es el caso de los residuos I174, F192, L259, L268, M306 y G342. Por otra parte, cuando comparamos este nuevo compuesto con **PF-543**, podemos observar la falta de interacción con el residuo D178, que es de gran importancia a la hora del anclaje de los inhibidores dentro del sitio activo[8]. Pero a su vez poseen interacciones más fuertes en algunos casos, como son los residuos I174 y G342 e interacciones de similar energía como el caso de los aminoácidos F192, L268 y M306. Comparando los análisis por residuos de estos tres compuestos, se puede predecir que la actividad de **25** frente a SphK1 se encontraría con un valor de IC_{50} menor a **SKI-II** y mayor a **PF-543**.

Continuando con el estudio del compuesto **25**, el próximo paso fue realizar cálculos QTAIM para analizar con más detalle las interacciones moleculares. Para este análisis se tuvieron en cuenta los inhibidores conocidos, **PF-543** y **SKI-II**, como así también los compuestos **19a**, **20a** y **25**. Estos resultados pueden verse en forma resumida en la Figura 6. En esta figura se puede ver que el valor de rho total ($\Sigma\rho(r)$) obtenido para **PF-543** es el más alto de todos estos compuestos y se puede apreciar que la mayor contribución a las interacciones está dada por la porción de la molécula que corresponde a su cabeza catiónica (barra color azul). Comparando con **PF-543**, los valores obtenidos para **SKI-II** y **19a** son sustancialmente más bajos e incluso se puede apreciar una significativa diferencia entre **SKI-II** y **19a** a favor de **SKI-II**. Estos resultados están en un total acuerdo con nuestros datos experimentales.

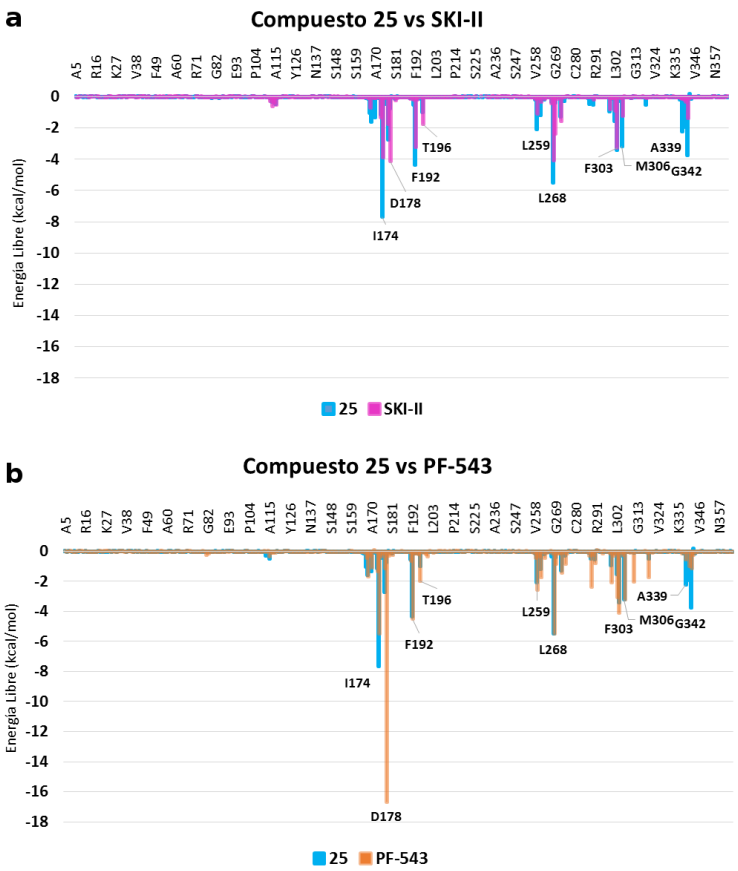


Fig. 5. Histogramas superpuestos que muestran las energías de interacción de los compuestos **25** (cian) *versus* **SKI-II** (magenta) **(a)** y **25** (cian) *versus* **PF-543** (naranja) **(b)** con los principales aminoácidos implicados en la formación del complejo.

En este análisis, se tomaron las dos conformaciones correspondientes de los compuestos **19a** y **20a** y se estudiaron como dos moléculas distintas; el asterisco en la Figura 6 indica la estructura invertida, esto quiere decir que la porción polar de la molécula se encuentra alojada en la región no polar/hidrofóbica del bolsillo de unión de la enzima. Como puede compararse, en ambos casos, la distribución "correcta" (la que ubica su parte polar en la región polar del sitio activo) posee una mayor interacción que aquella que se sitúa en la forma "invertida". Esto podría justificar una menor actividad de estos dos compuestos comparados con **SKI-II**, ya que en base a nuestras simulaciones, no es posible determinar en qué proporción los compuestos se ubican de una u otra manera.

Son particularmente interesante los resultados obtenidos para **25,** ya que los valores de ρ(r) obtenidos para este compuesto indican que el mismo tiene interacciones más fuertes que **SKI-II** y **19a**. En este sentido es interesante notar que el aumento de ρ(r) total se debe fundamentalmente al incremento que se observa en las interacciones de su cabeza catiónica (casi el doble al que muestra **19a**). Estas interacciones se pueden ver con más detalles en los gráficos moleculares obtenidos para

estos compuestos (Figura 7).

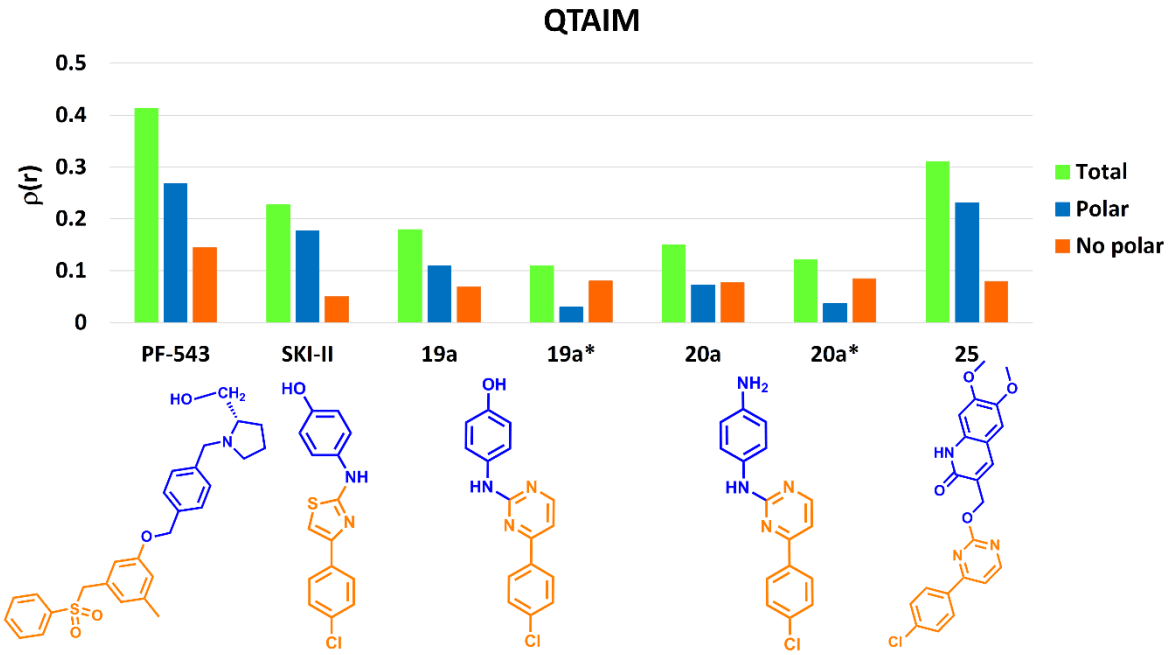


Fig. 6. Grafico del análisis por QTAIM realizado a los compuestos **PF-543**, **SKI-II**, **19a**, **20a** y **25**. La barra verde indica el valor total de rho (Σρ(r)) para cada compuesto. Las barras azules y naranjas corresponden al valor de rho (ρ(r)) para la porción polar y no polar, respectivamente. Debajo de cada conjunto de barras, se encuentra graficado la estructura química del compuesto. En éstos, se encuentran simbolizados la zona que se consideró polar y no polar en color azul y naranja, respectivamente. Los compuestos indicados con asterisco (*) representan la estructura obtenida por docking molecular en la cual se sitúan de manera "invertida" con respecto a **SKI-II** cristalizado en el sitio activo de la proteína.

La Figura 7a muestra las interacciones principales con los residuos: I174, V177, D178, T196, L268, F303 y M306, que estabilizan **SKI-II** en su complejo con SphK1. Un punto crítico de enlace (BCP por sus siglas en inglés, Bond Critical Point) y las rutas de enlace correspondientes que conectan el grupo oxhidrilo de **SKI-II** con el grupo carboxílico del residuo D178 se pueden observar en el gráfico molecular de la Figura 7a. El valor de densidad de carga local (ρ(r)) en este BCP es 0,0631 u.a. que corresponde a un enlace puente de hidrógeno fuerte[13]. **SKI-II** también interactúa con el residuo T196 a nivel del grupo amino formando un enlace puente de hidrógeno moderado con el OH de este residuo (ρ(r) = 0,0227 u.a.). Además, este ligando forma varias interacciones intermoleculares hidrofóbicas con los residuos I174, V177 y L268 en la zona correspondiente al anillo fenólico. En conjunto, las interacciones con I174, V177 y L268 contribuyen en 0,0277 u.a., 0,0114 u.a. y 0,0162 u.a. de densidad de carga, respectivamente. Por otra parte, el átomo de azufre del anillo tiazólico presenta interacciones débiles con el residuo F303 (Σρ(r) = 0,0143 u.a.). La fuerza de este enlace relativamente débil, parece ser importante para el adecuado posicionamiento del inhibidor en la cavidad

de la enzima. El residuo M306 establece interacciones débiles en la región no polar del ligando ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0157 u.a.).

La estructura del compuesto **19a** se diseñó reemplazando el anillo tiazol de **SKI-II** por un anillo de pirimidina. Esto produce grandes cambios a nivel de las interacciones que estabilizan al complejo en el sitio activo de la proteína como así también como el posicionamiento dentro de la misma (Figura 7b). Cabe destacar que el grupo oxhidrilo del anillo fenólico, en lugar de establecer interacciones con D178, forma un enlace puente hidrógeno débil con el grupo OH de T196 ($\rho(r)$ = 0,0055 u.a.). La principal interacción en este complejo corresponde a un puente de hidrógeno moderado N-H···O=CO ($\rho(r)$ = 0,0287 u.a.) con L268. A su vez, la región no polar de la molécula se estabiliza mediante interacciones con I174, S168 y G342 que contribuyen en 0,0543 u.a., 0,0225 u.a. y 0,0088 u.a., respectivamente. Estos resultados están en total acuerdo con los datos experimentales ya que **19a** presenta una actividad inhibitoria más débil que **SKI-II**.

El compuesto **25** (Figura 7c) que posee un anillo quinolínico en la región polar de la molécula, presenta un mayor número de interacciones y de considerable fortaleza comparado con **19a**. Las interacciones de la región no polar contribuyen en 0,0797 u.a., incluyendo tanto el anillo de *p*-clorofenilo como el anillo pirimidínico. Es importante resaltar que este valor no es muy diferente al obtenido para el compuesto **19a** ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0693 u.a.). En conclusión, las principales interacciones que determinarían la actividad inhibitoria del compuesto se encontrarían en la región polar de la molécula.

Se observó que el grupo metilo, sustituyente del anillo quinolínico, forma enlaces de hidrógeno CH···O con S168, los cuales son estabilizadores dentro de la estructura de la proteína. Estas interacciones se mantienen a lo largo de toda la dinámica de la proteína y participan en el movimiento correlacionado ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0224 u.a.)[14]. El residuo G342 establece interacciones moderadas con los oxígenos sustituyentes del anillo quinolínico con un valor de $\rho(r)$ = 0,0245 u.a..

La interacción más importante en este complejo se establece entre un hidrógeno del anillo quinolínico y un oxigeno del residuo I174 (N-H···O), con un puente hidrogeno fuerte correspondiente a $\rho(r)$ = 0,0528 u.a.. A su vez, encontramos una gran cantidad de interacciones estabilizantes del tipo hidrofóbicas con F192, las cuales contribuyen en su totalidad con $\Sigma\rho(r)$ = 0,0235 u.a.. De la misma manera, M272 y L268 contribuyen en menor medida al anclaje de este compuesto con $\rho(r)$ = 0,0033 u.a. y 0,0245 u.a. respectivamente.

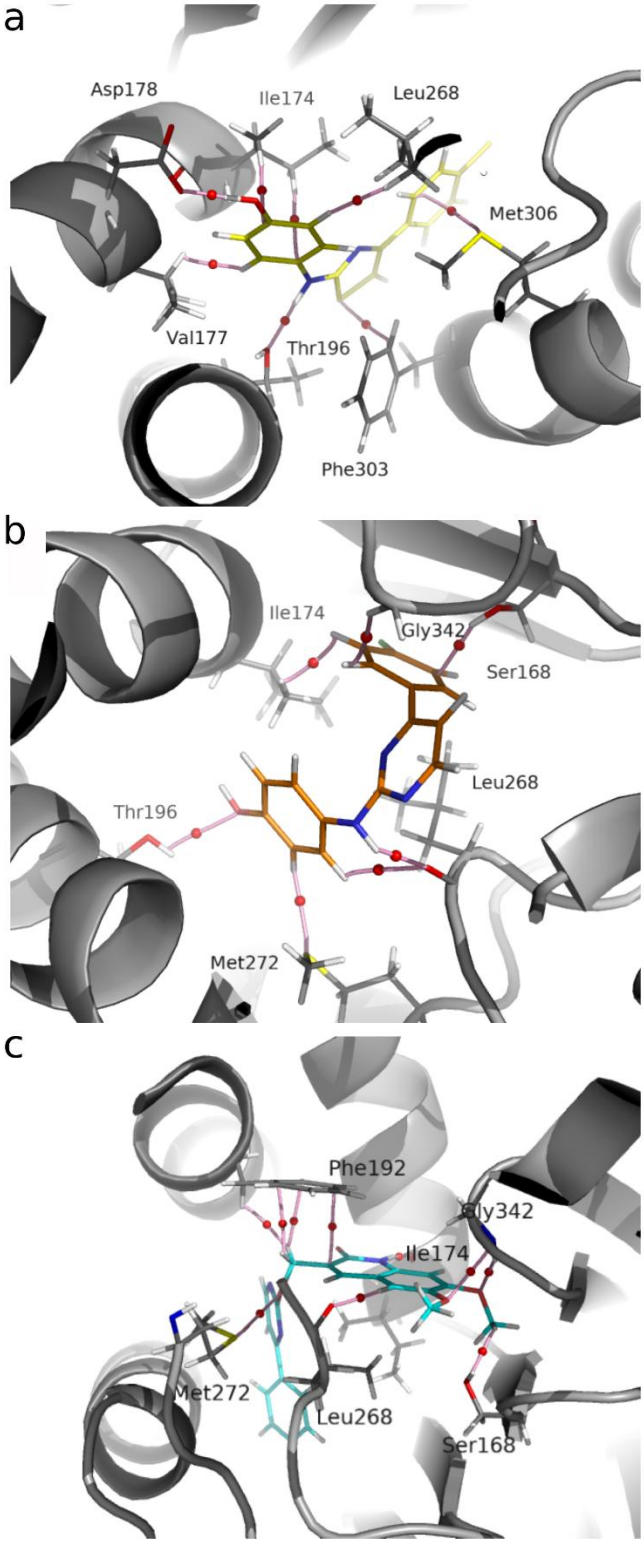


Fig. 7. Gráfica molecular de la densidad de carga obtenida para el complejo de SphK1 con **(a) SKI-II** (amarillo), **(b)** compuesto **19a** (naranja) y **(c)** compuesto **25** (cian). Las líneas amarillas que conectan los núcleos son las rutas de enlace, y las pequeñas esferas rojas sobre ellas son los puntos críticos de enlace (BCP).

Sobre la base de estos resultados, es evidente que se justificaba la síntesis del compuesto **25** y por lo tanto el próximo paso fue realizar la síntesis química de este compuesto. La misma se detalla junto con las demás síntesis realizadas, en la parte final de este capítulo.

Una vez sintetizado el compuesto **25**, se procedió a su evaluación como potencial inhibidor de SphK1. Este compuesto mostró una actividad inhibitoria sobre la enzima de 13,1 μM, siendo más potente que **19a**. Si bien la actividad del compuesto **25** es, aún más pobre que **PF-543**, este resultado fue muy alentador ya que estaba en línea con los resultados de modelado molecular.

7.2.3. Nueva serie de inhibidores

Mirando con mayor detalle el sitio de unión de la enzima, se puede observar que hay bastante espacio para extender un poco más la estructura de estos ligandos y por lo tanto, nuestro próximo paso en este estudio fue buscar cadenas conectoras un poco más extensas que unieran la cabeza polar con la porción hidrofóbica. Se seleccionaron tres tipos de espaciadores incluyendo un fragmento α,β-insaturado, un anillo de piperazina y dos anillos arílicos: a, b y c, respectivamente (Figura 8). De esta manera se diseñaron y sintetizaron los compuestos **26-35** (Tabla 2 y 3).

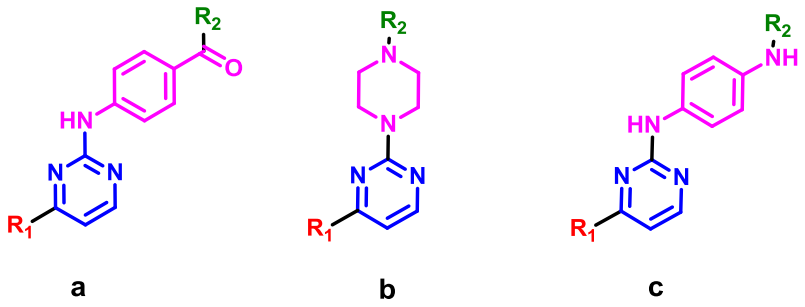
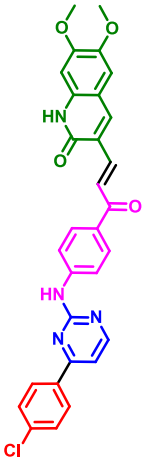
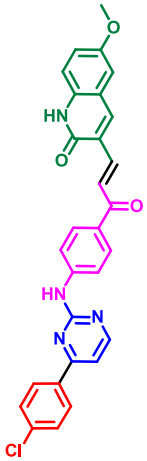
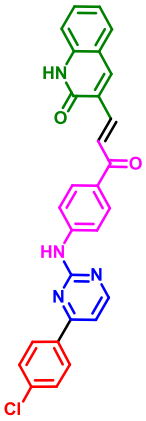
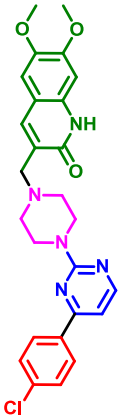
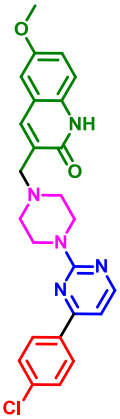
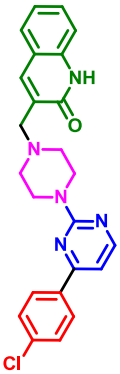


Fig. 8. Estructura de tres tipos de espaciadores correspondientes a: **(a)** un fragmento α,β-insaturado, **(b)** un anillo de piperazina y **(c)** dos anillos arílicos respectivamente.

Algunos de estos nuevos compuestos mostraron actividades inhibitorias aún más fuertes que el compuesto **19a** (utilizado como punto de partida para esta nueva serie), como por ejemplo: **26b**, **27a**, **27b**, **32a**, **32b**, **33b** y **35b**, entre otros. Observando las características estructurales de estos compuestos es posible establecer ciertas correlaciones entre la estructura y la actividad. Por ejemplo, ningún compuesto con la cadena conectora tipo "b" mostro efectos inhibitorios significativos (**29**-**31**); aparentemente este tipo de cadena conectora da lugar a un ordenamiento espacial no favorable para esta serie de compuestos.

Tabla 2. Características estructurales de los nuevos compuestos sintetizados. Se muestran los valores de IC_{50} obtenidos para aquellos compuestos con IC_{50} < 200 μM.

26a	27a	28a	29a	30a	31a
					
	SphK1 = 19,2 μM				

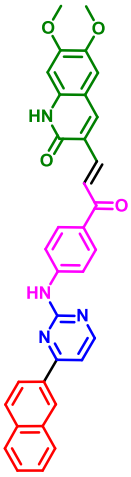
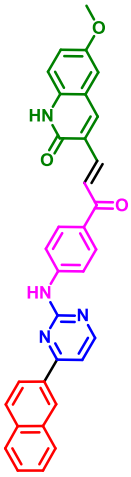
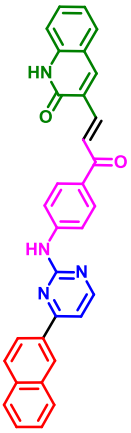
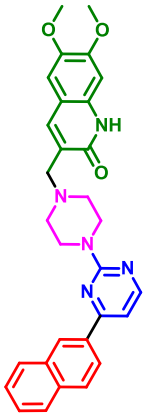
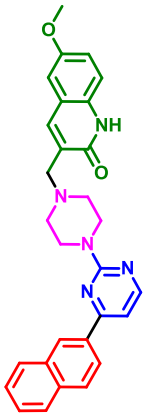
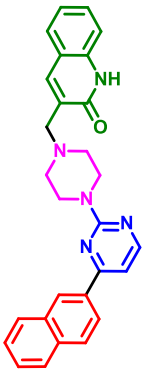
26b	27b	28b	29b	30b	31b
					
SphK1 = 13,0 μM SphK2 = 7,1 μM	SphK1 = 4,2 μM				

Tabla 3. Características estructurales de los nuevos compuestos sintetizados. Se muestran los valores de IC_{50} obtenidos para aquellos compuestos con IC_{50} < 200 μM.

32a	**33a**	**34a**	
SphK1 = 16,7 μM			
32b	**33b**	**34b**	**35b**
SphK1 = 13,4 μM SphK2 = 14,0 μM	SphK1 = 13,2 μM SphK2 = 8,9 μM		SphK1 = 17,0 μM SphK2 = 15,6 μM

Por otra parte, el sustituyente con doble anillo bencénico en la porción hidrofóbica de la molécula presenta ventajas con respecto al anillo bencénico con sustituyente Cl en posición '*para*'. Esto puede observarse si se compara las actividades obtenidas para los compuestos **27a** y **27b** como así también entre **32a** y **32b**. Por otro lado, tampoco se aprecia una mejora sustancial en la actividad si se reemplaza los grupos metoxilos por oxhidrilos (observar las actividades similares obtenidas para **32b** y **35b**).

Para poder entender mejor a nivel sub-molecular el comportamiento

de estos compuestos realizamos estudios de simulación molecular y cálculos QTAIM para esta nueva serie. La Figura 9 muestra los resultados del análisis por residuo obtenido para los compuestos **27b** y **33b** en el cual se los compara con **PF-543**. En estos gráficos se puede observar que tanto **27b** como **33b** tienen varias interacciones similares a las de **PF-543**, como por ejemplo aquellas con L259, L268, F303 y L319 para el compuesto **27b** y I174, F192, L259, F303 y M306 para **33b**. Sin embargo, se puede apreciar una diferencia importante cuando se compara la interacción con el residuo D81 entre el compuesto **27b** y **PF-543**, ya que esta interacción es muy débil (casi marginal) para **PF-543** y bastante significativa para **27b**, con casi -4 Kcal/mol (Figura 8a). En el caso de **33b**, esta interacción es casi inexistente como se puede apreciar en la Figura 8b. Por otro lado, ninguno de los nuevos compuestos presenta interacciones significativas con D178, el cual es un residuo muy importante para el anclaje de los ligandos dentro del sitio activo.

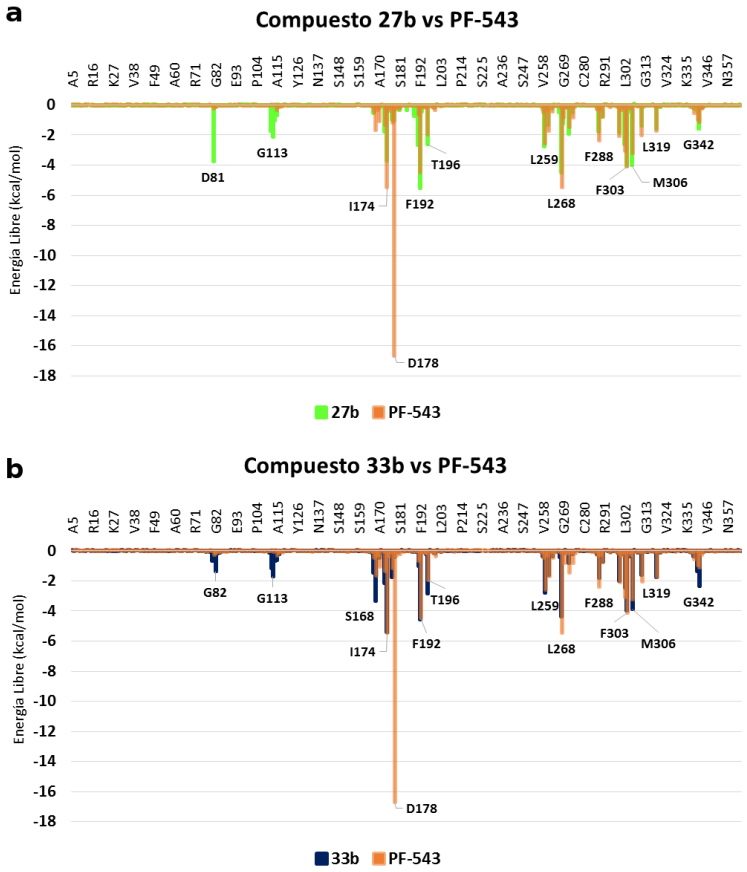


Fig. 9. Histogramas superpuestos que muestran las energías de interacción de los compuestos **27b** (verde) **(a)** y **33b** (azul) **(b)** con respecto a los valores obtenidos para el inhibidor **PF-543** (naranja).

Por su parte el estudio QTAIM de estos compuestos nos permitió obtener un cuadro bastante claro en lo que respecta a las interacciones moleculares que están estabilizando la formación de estos complejos

moleculares. En la Figura 10, se pueden ver los valores de rho (ρ(r)) obtenidos para los compuestos **PF-543**, **26b**, **27a**, **27b**, **32a**, **32b** y **33b**. Tal como puede apreciarse en este gráfico, estos nuevos compuestos tienen interacciones moleculares más débiles que **PF-543**, y éstos resultados están en completo acuerdo con los resultados experimentales obtenidos respecto a sus actividades inhibitorias.

Si analizamos **PF-543** con respecto al resto de la serie, podemos notar que ninguno logra tener interacciones tan potentes como este inhibidor. Por otro lado, comparando los compuestos **27a**, **27b** y **33b** observamos valores muy similares en las barras azules que corresponden a la porción polar de la molécula. Esto es lógico, debido a que tienen la misma estructura en esa parte de la molécula. Por otra parte, es importante destacar una menor interacción en la región hidrofóbica del compuesto **27a** con respecto al compuesto **27b**. Esto nos está indicando que la porción hidrofóbica preferida se corresponde con el doble anillo bencénico. Lo mismo ocurre si vemos la barra naranja de los compuestos **32a** y **32b**.

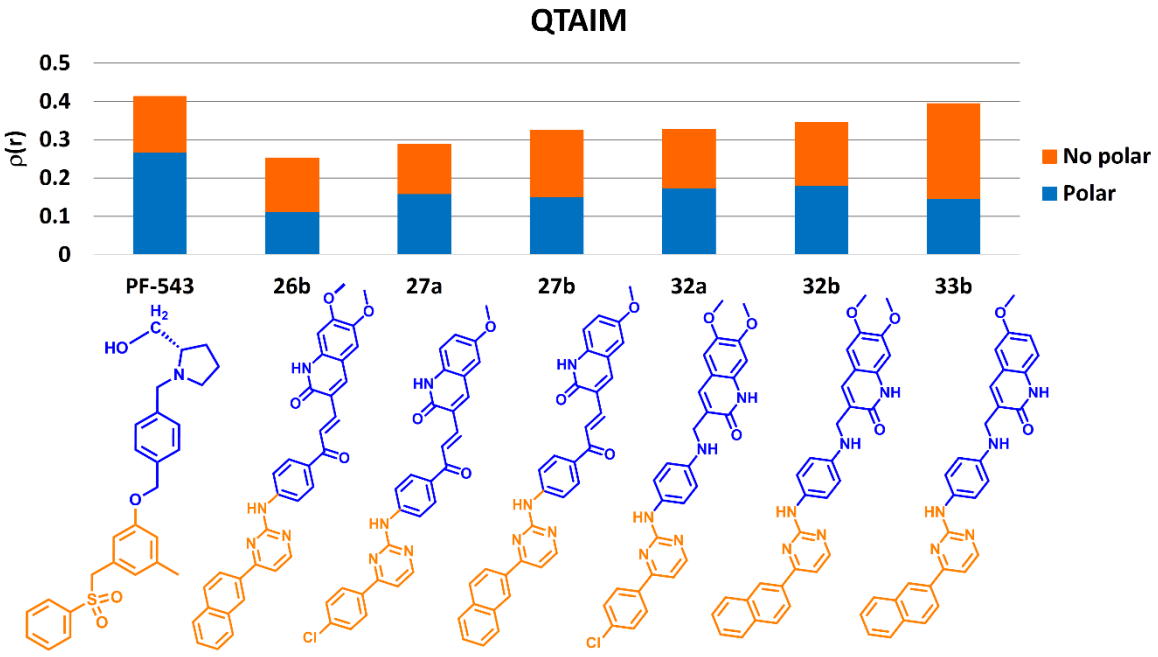


Fig. 10. Análisis por QTAIM realizado a los compuestos **PF-543**, **26a**, **27a**, **27b**, **32a**, **32b** y **33b**. Las barras azules y naranjas corresponden al valor de rho (ρ(r)) para la porción polar y no polar del ligando, respectivamente. Debajo de cada conjunto de barras, se encuentra graficado la estructura química del compuesto. En éstos, se encuentran simbolizados la zona que se consideró polar y no polar de color naranja y azul respectivamente.

El caso del compuesto **33b** es diferente, porque en este caso, los cálculos de QTAIM reconocen que las interacciones de la porción hidrofóbica (naranja) de la molécula, reúnen una mayor energía que en el

caso de los demás compuestos de esta serie. Esto puede deberse a una localización diferente dentro del sitio activo de la proteína, y por lo tanto las interacciones estabilizantes no serían las mismas que con los demás compuestos. Esto puede observarse en la Figura 11.

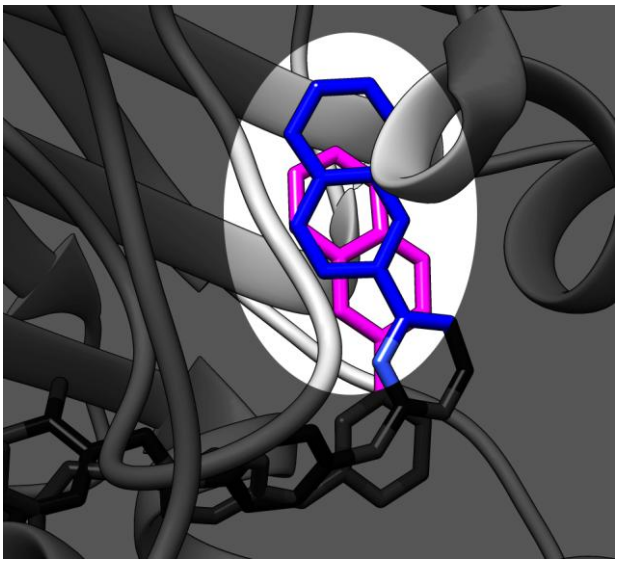


Fig. 11. Compuesto **32b** (magenta) y **33b** (azul) dentro del sitio activo de la proteína. Se destaca la porción no polar de los compuestos, evidenciando una diferente localización dentro del bolsillo de unión.

Para poder describir con más detalles estas interacciones moleculares, la Figura 12 muestra los grafos moleculares obtenidos para los compuestos **27b** y **33b**, siendo éstos compuestos los más activos dentro de cada serie con las cadenas conectoras tipo a y c, respectivamente (Figura 8).

De la misma manera que se observó en el gráfico de descomposición por residuo, en el grafo molecular para el compuesto **27b** (Figura 12a) es posible observar el puente hidrógeno formado entre el grupo amino del anillo quinolínico y el oxígeno de D81 (N-H···O-C=O) con un valor de $\rho(r)$ = 0,0346 u.a. Si bien esta interacción es solo moderada, es muy importante para el correcto anclaje de la molécula dentro del sitio activo, estando ausente en el compuesto **33b**, donde esta interacción es reemplazada con un puente hidrógeno más débil con S168, $\rho(r)$ = 0,0215 u.a. (Figura 12b).

Continuando con la descripción del compuesto **27b**, apreciamos tres interacciones del tipo estabilizantes con el residuo D178, las cuales suman un total de $\Sigma\rho(r)$ = 0,0201 u.a.. Como dijimos anteriormente, estas interacciones no se encuentran presentes en el compuesto **33b**, y por lo tanto, debido a su gran importancia, justificarían el menor desempeño de este compuesto con respecto a **27b**. Por otra parte, F192 establece una interacción del tipo π-stacking claramente visible en el grafo molecular,

con un valor de rho total igual a 0,0274 u.a.. En la región del anillo pirimidínico se establecen interacciones importantes con I174, T196 y F303 con ρ(r) = 0,0079; 0,0380 y 0,0100 u.a., respectivamente. El anillo naftalénico se estabiliza con la ayuda de L302 con un ρ(r) = 0,0128 u.a..

Considerando el compuesto **33b**, podemos observar que si bien tiene una mayor cantidad de interacciones estabilizantes, éstas se encuentran concentradas principalmente en la zona hidrofóbica del sitio activo, lo cual no genera ventajas con respecto a una mejor unión dentro del sitio (Figura 12b y Figura 10). Se puede apreciar una diferente localización del ligando dentro del sitio activo con respecto a **27b**, lo que origina diferentes tipos de interacciones.

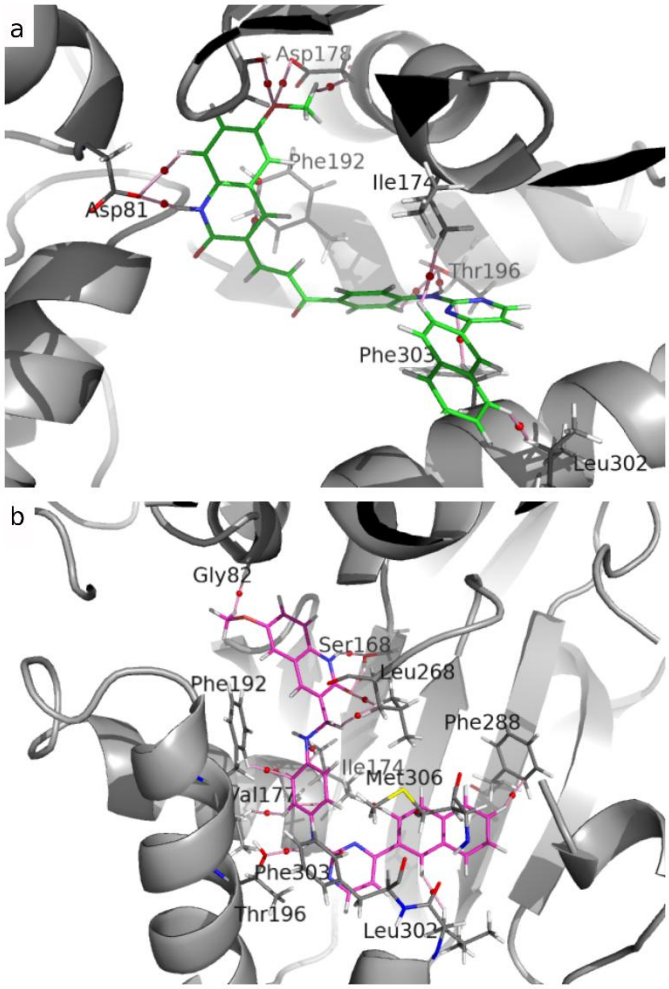


Fig. 12. Gráfica molecular de la densidad de carga obtenida para el complejo de SphK1 con **(a) 27b** (verde) y **(b) 33b** (magenta). Las líneas amarillas que conectan los núcleos son las rutas de enlace, y las pequeñas esferas rojas sobre ellas son los puntos críticos de enlace (BCP).

El anillo quinolínico se encuentra estabilizado principalmente por la interacción con G82, S168 y L268 con un $\Sigma\rho(r)$ = 0,0196; 0,0215 y 0,0244 u.a. respectivamente, lo cual aporta un total de 0,0655 u.a. a la región polar de la molécula. La parte central del ligando formada por los dos anillos arílicos, es la que presenta un mayor conjunto de interacciones estabilizantes, siendo I174 la más importante con $\Sigma\rho(r)$ = 0,0400 u.a. Así también podemos observar a V177 ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0169 u.a.), F192 ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0263 u.a.), T196 ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0281 u.a.) y F303 ($\Sigma\rho(r)$ = 0,0288 u.a.). El anillo naftalénico interacciona principalmente con los residuos hidrofóbicos F288, M306 y L302, los cuales suman un rho total de 0,0652 u.a..

7.3. Síntesis química

La síntesis de los compuestos **19-35** fue llevada a cabo en el Departamento de Química de la Universidad de Jaén (España) bajo la dirección del Dr. Justo Cobo.

El diseño estructural de los posibles inhibidores de esfingosina quinasa se basó en las estructuras de los compuestos **SKI-II** y **1v2** (Figura 13), debido a que estos han proporcionado información valiosa sobre los requisitos estructurales necesarios para el correcto anclaje en el sitio activo de la proteína. El análisis estructural de estos inhibidores sugiere que su estructura debe estar compuesta con una parte hidrófoba (fragmento I), un núcleo central (fragmento II), una funcionalidad amina y una porción polar unida a un espaciador de tipo fenilo (fragmento III). En base a estas consideraciones, se propuso la sustitución del núcleo central por un anillo de pirimidina que puede actuar como potencial agente anticancerígeno[15].

Además, con el objetivo de evaluar la rigidez y la longitud del espaciador entre el grupo NH y la porción hidrofílica, se seleccionaron tres tipos de espaciadores incluyendo un fragmento α,β-insaturado, un anillo de piperazina y dos anillos arílicos. Como fragmento hidrofílico se seleccionaron 2-oxo-quinolinas sustituidas para evaluar las interacciones con los residuos de unión de la enzima. Finalmente, como porción hidrofóbica se seleccionaron el *p*-clorofenilo y el 2-naftilo, ya que estos fragmentos se encuentran en compuestos que han presentado excelentes propiedades frente a esfingosina quinasa. A partir de este diseño racional se obtuvieron los compuestos **26-35**.

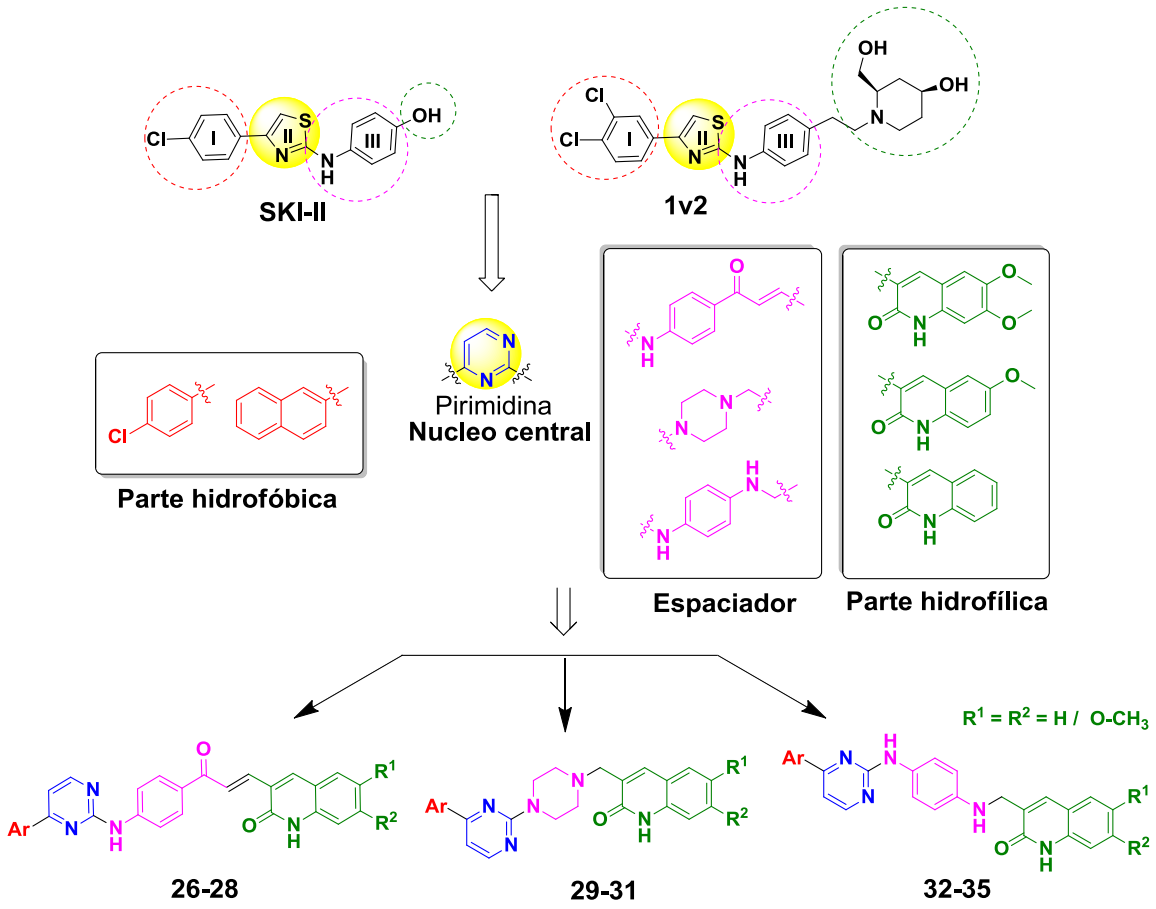
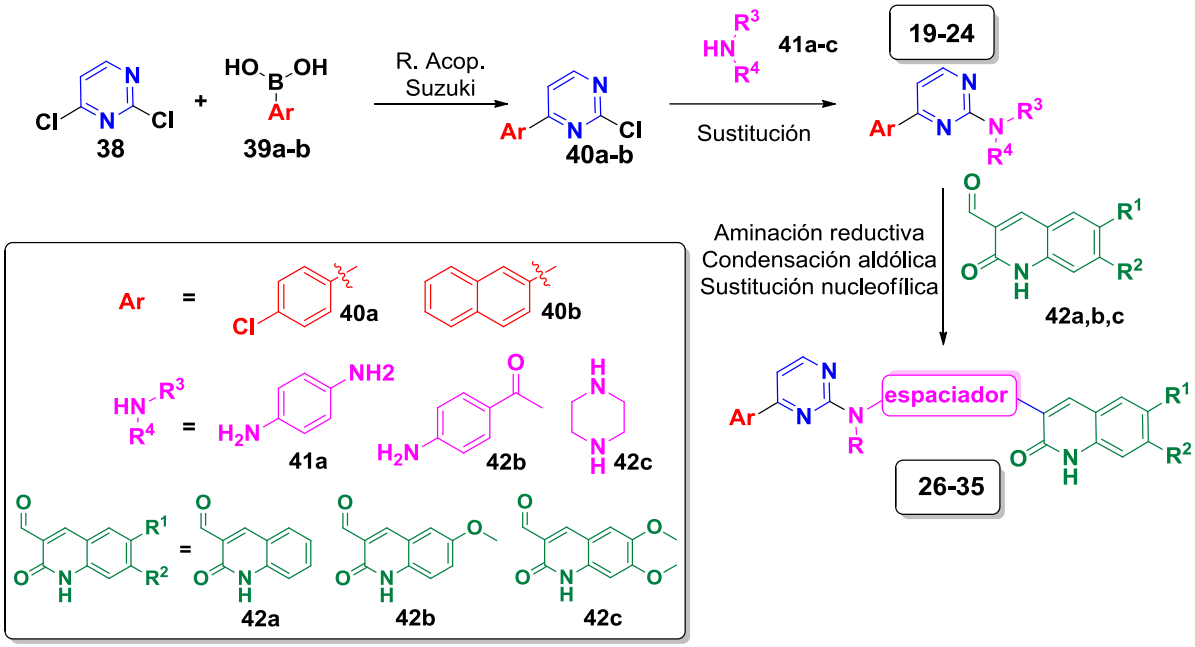


Fig. 13. Esquema general del diseño de los compuestos llevada a cabo en este capítulo.

7.3.1. Síntesis de híbridos de 2-oxoquinolina y pirimidina

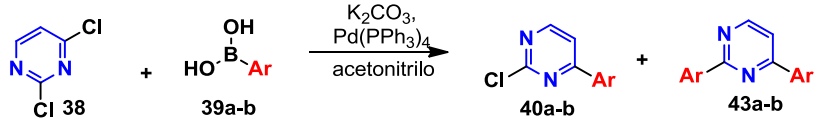
Para llevar a cabo la síntesis de los híbridos de 2-oxoquinolina y pirimidina (**26-35**), se efectuó un proceso de tres etapas (Esquema 1). En la primera etapa se generaron los intermediarios 2-cloro-4-arilpirimidinas (**40**), mediante una reacción de acoplamiento cruzado tipo Suzuki, a partir de la 2,4-dicloropirimidina (**38**) y los ácidos arilborónicos (**39**). La segunda etapa consistió en la sustitución del átomo de cloro utilizando diferentes aminas (**41**) (*p*-fenilendiamina, 4-aminoacetofenona y piperazina) para generar los sistemas **19-24**. La última etapa fue el acoplamiento de los aldehídos 3-formil-2-oxoquinolina (**42a,b,c**) a los intermediarios **19-24**, mediante reacciones de aminación reductiva, condensación aldólica y sustitución nucleofílica, las cuales condujeron a los productos objetivos **26-35**.



Esquema 1. Ruta sintética para la obtención de los híbridos de 2-oxoquinolina y pirimidina (**26-35**).

Para dar cumplimiento a la primera etapa de la ruta sintética propuesta en el Esquema 1, se llevó a cabo la síntesis de los intermediarios 2-cloro-4-arilpirimidinas (**40a-b**). Se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Park y colaboradores[16] (Tabla 4), empleando 2,4-dicloropirimidina (**38**), los ácidos arilborónicos (**39**) y K_2CO_3 (acuoso), con $Pd(PPh_3)_4$ como catalizador y acetonitrilo como disolvente. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 5-7 hs. La reacción se monitoreo por CCD, obteniéndose dos productos identificados como 2-cloro-4-arilpirimidina (**40a-b**) y 2,4-diarilprimidina (**43a-b**). En ambos casos, el producto principal del acoplamiento correspondió a los compuestos deseados (**40a-b**) con un rendimiento aproximado a 87% (Tabla 4), mientras que los compuestos (**43a-b**) fueron obtenidos bajas proporciones.

Tabla 4. Síntesis de las 2-cloro-4-arilpirimidinas (**40a-b**).

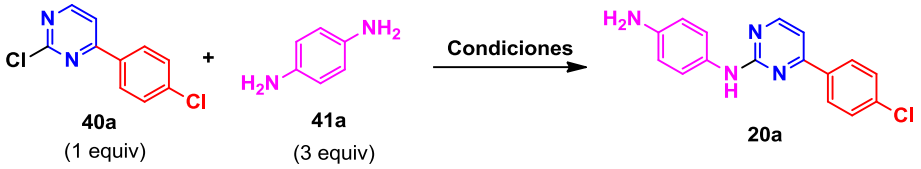


Compuesto	Ar	Rendimiento (%)	Tiempo
40a/43a	4-Cl-C_6H_4-	78/12	5 h
40b/43b	naftilo	90/7	7 h

7.3.1.1. Síntesis de los intermediarios N-(4-aril)-4-arilpirimidin-2-aminas (19-22) y 4-aril-2-(piperazin-1-il)pirimidinas (23 y 24)

Una vez obtenidas las 2-cloro-4-arilpirimidinas (**40a-b**), se procedió a la síntesis de los intermediarios **19-24**. Para ello, el estudio se realizó empleando como modelo de reacción la mezcla entre la 2-cloro-4-(4-clorofenil)pirimidina (**40a**) y *p*-fenilendiamina (**41a**). Se evaluaron diferentes condiciones de reacción, incluyendo calentamiento convencional, fusión y radiación de microondas (Tabla 5).

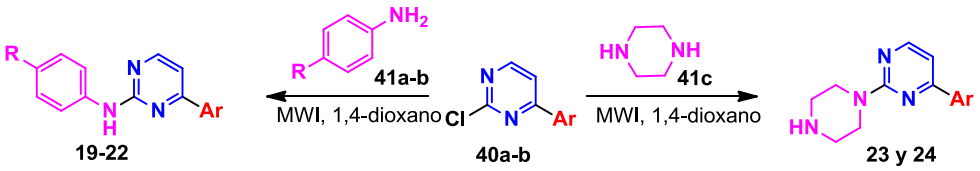
Tabla 5. Optimización de las condiciones para la obtención de los intermediarios (**19-24**).



Ensayo	Disolvente	Método	Tiempo (min)	Rend.
1	EtOH	Reflujo	720	-
2	-	Fusión	30	20
3	EtOH	MWI (80 °C, 250 W)	30	25
4	BuOH	MWI (120 °C, 250 W)	30	53
5	1,4-dioxano	MWI (120 °C, 250 W)	30	83

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 1,4-dioxano (1 mL) como disolvente a 120 °C y con microondas a 250 W durante 30 minutos.

Una vez establecidas las condiciones para la formación del compuesto **20a**, la metodología se extrapoló a la síntesis del resto de los intermediarios **19-24** (Esquema 2). Los productos obtenidos fueron purificados por recristalización en etanol o por separación cromatografía de columna. En todos los casos se obtuvieron muy buenos rendimientos entre 65-81%.

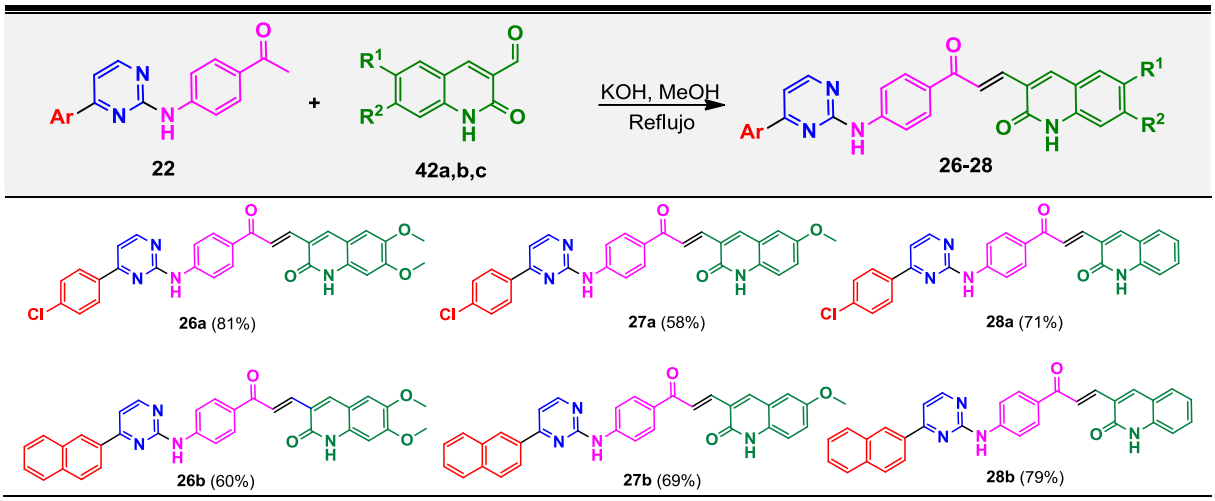


Esquema 2. Síntesis de los intermediarios *N*-(4-aril)-4-arilpirimidin-2-aminas (**19-22**) y 4-aril-2-(piperazin-1-il)pirimidinas (**23** y **24**)

7.3.1.2. Síntesis de las (*E*)-3-(3-oxo-3-(4-((4-arilpirimidin-2-il)amino)fenil)prop-1-en-1-il)quinolin-2(1*H*)-onas (26-28)

La síntesis de las chalconas **26-28** se llevó a cabo mediante una condensación tipo Claisen-Schmidt entre los quinolin-aldehídos (**42a,b,c**) y las 1-(4-((4-fenilpirimidin-2-il)amino)fenil)etan-1-onas (**22a-b**), utilizando MeOH como disolvente y KOH como catalizador, bajo calentamiento a reflujo por un período de 4 días. Esta metodología condujo a la formación de las chalconas **26-28**, con rendimientos entre 58-81% (Tabla 6).

Tabla 6. Síntesis de las (*E*)-3-(3-oxo-3-(4-((4-arilpirimidin-2-il)amino)fenil)prop-1-en-1-il)quinolin-2(1*H*)-onas (**26-28**).

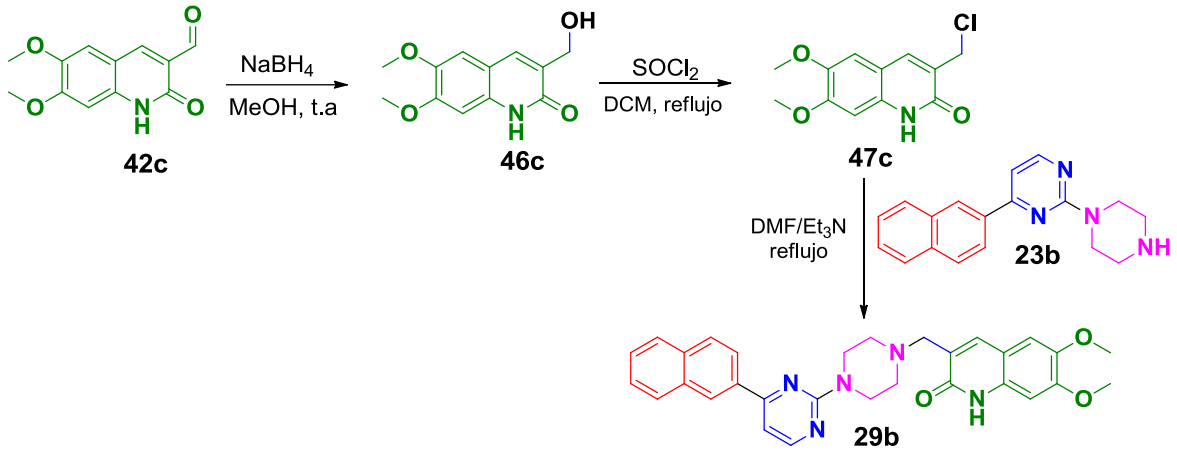


7.3.1.3. Síntesis de las 3-((4-arilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)quinolin-2(1*H*)-onas (29-31)

Se llevó a cabo la síntesis de las 3-((4-arilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)quinolin-2(1*H*)-onas (**29-31**), con el objetivo de evaluar las propiedades de la piperazina utilizada como puente entre el anillo de pirimidina y las 3-formil-quinolonas (**42a,b,c**). Para ello, se planteó un procedimiento *one-pot* que involucra la formación de los quinolin-3-(clorometil)quinolin-2(1*H*)-onas (**47**) a partir del alcohol **46** y la posterior sustitución nucleofílica de la 4-fenil-2-(piperazin-1-il)pirimidinas como se describe en el Esquema 3.

Con el fin de obtener los productos **29**, como reacción modelo se utilizó la quinolona **42c** y el compuesto **23b**. Inicialmente, se realizó la síntesis del quinolin-alcohol **46a** mediante una reducción química de la 3-formil-quinolona **42c**. Para ello, se disolvió la 2-oxo-quinolona **42c** (3

mmol) en 15 mL de MeOH y se adicionó el $NaBH_4$ (5,0 equiv.). La mezcla se sometió a agitación a temperatura ambiente por 18 hs. hasta que el material de partida no fue detectado por CCD. Posteriormente, el disolvente se removió a presión reducida y se adicionaron 5 mL de agua, el sólido formado se filtró y purificó mediante recristalización en MeOH, obteniendo el quinolin-alcohol **46a** con un rendimiento del 85%.



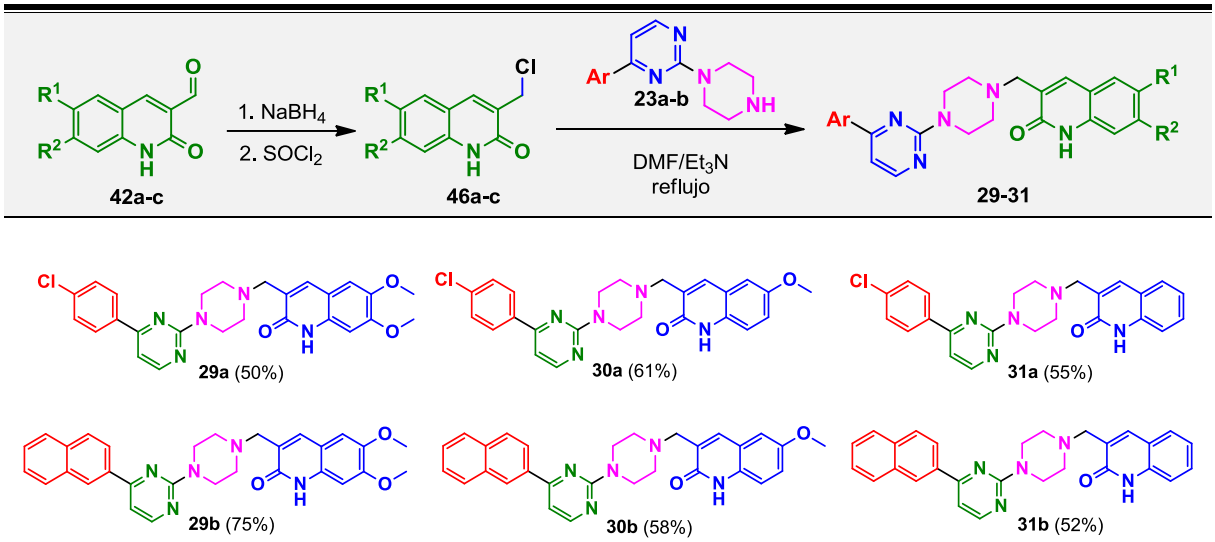
Esquema 3. Estrategia sintética para obtener (*E*)-3-(3-oxo-3-(4-((4-arilpirimidin-2-il)amino)fenil)prop-1-en-1-il)quinolin-2(1*H*)-ona (**29b**).

Una vez que se obtuvo el quinolin-alcohol **46a**, se procedió a realizar el protocolo *one-pot,* el cual se inició con la formación del intermedio clorado **47a**, a partir de la adición de cloruro de tionilo ($SOCl_2$, 3 equiv.) a una solución del compuesto **46a** (1mmol) en diclorometano. Después de 3 hs. de reacción, se observó por CCD la formación de un nuevo producto y el consumo total del precursor. Posteriormente, el diclorometano y el exceso de cloruro de tionilo se removieron a presión reducida y sobre el crudo de reacción y se adicionó una solución de 4-fenil-2-(piperazin-1-il)pirimidina (**23b**) (1 mmol) en DMF y 1,3 equiv. de K_2CO_3. La mezcla de reacción se sometió a agitación y a reflujo durante 10 hs. Al cabo de este tiempo, se observó por una mezcla compleja de productos por lo cual la reacción se suspendió.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones para la obtención del producto esperado (**29b**), se realizó un nuevo ensayo utilizando el mismo procedimiento, reemplazando K_2CO_3 por Et_3N. Después de 2 hs. de calentamiento a reflujo, el análisis por CCD reveló que los materiales de partida se consumieron en su totalidad. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el sólido formado se filtró y purificó por cromatografía de columna, usando una mezcla CH_2Cl_2/MeOH (20:1) como eluyente. El producto **29b** se obtuvo con un rendimiento del 75% (Tabla 8).

Se evaluó el alcance del protocolo establecido para la formación de los compuestos **29-31**, empleando los quinolin-aldehídos **42a,b,c** y las 4-aril-2-(piperazin-1-il)pirimidinas **23a-b**. Mediante estas condiciones se obtuvieron los productos esperados **29-31**, con rendimientos entre el 50-75% (Tabla 7).

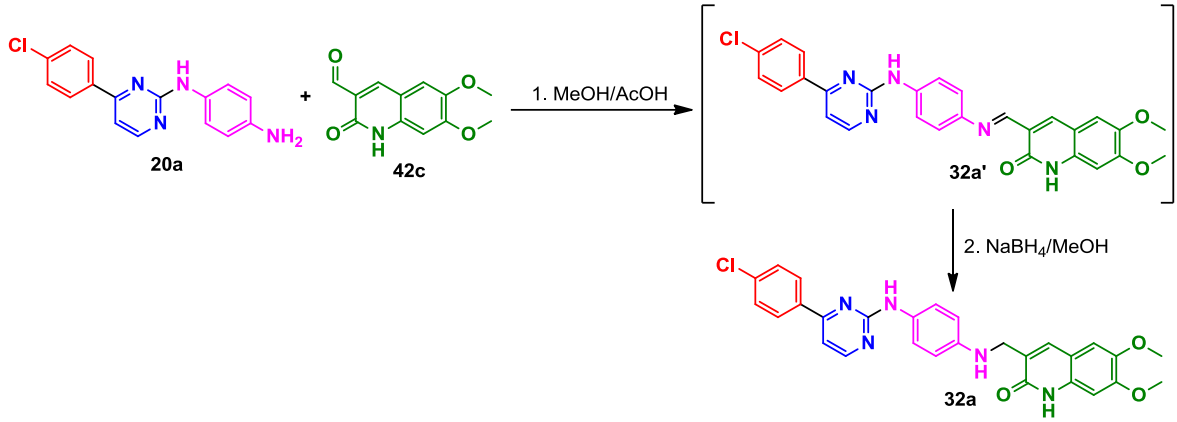
Tabla 7. Síntesis de 3-((4-arilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)quinolin-2(1*H*)-onas (**29-31**).



7.3.2. Síntesis de las 3-(((4-((4-arilpirimidin-2-il)amino)fenil)amino)metil)quinolin-2(1*H*)-onas

Después de sintetizar los intermediarios **19-24** se planeó un modelo de reacción entre el compuesto **20a** y el quinolin-aldehído **42c** (Esquema 4), con el fin de obtener el híbrido **32a'** a través de un procedimiento *one-pot* el cual involucra una reacción de condensación, seguido de una reducción. Para ello, una mezcla del compuesto **20a** (1 mmol) y el 6,7-dimetoxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbaldehído (**42c**) (1 mmol) se disolvió en 10 mL de MeOH utilizando cantidades catalíticas de AcOH. La reacción se sometió a agitación a 60 °C, por un periodo de 5 hs. hasta que la amina de partida (**20a**) no fue detectada por CCD. Posteriormente, se llevó a cabo la reducción mediante la adición de $NaBH_4$ (7 mmol) durante 1 hora, en intervalos de 10 min. La agitación continuó a temperatura ambiente durante 12 hs. hasta el consumo total de la imina **32a'**. Seguidamente, el disolvente se removió a presión reducida y se adicionaron 5 mL de agua, obteniendo la formación de un sólido el cual se

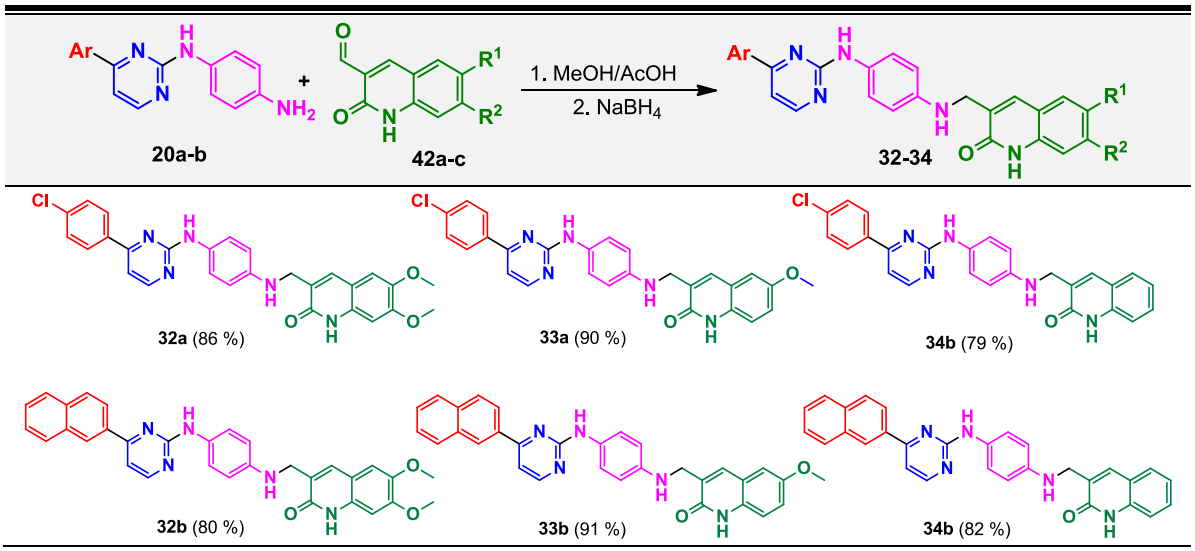
filtró y lavó con EtOH. Estas condiciones permitieron obtener el producto **32a** con un rendimiento del 86%.



Esquema 4. Estrategia para obtener 3-(((4-((4-arilpirimidin-2-il)amino)fenil)amino)metil)quinolin-2(1*H*)-onas (**32a**).

La metodología encontrada para la obtención del compuesto **32a**, fue extrapolada a los intermedios **20a-b** y a los quinolin-aldehídos **42a,b,c**. La reacción procedió de forma similar como sucedió con las aminas **20a**. En todos los casos los productos fueron aislados por filtración al vacío y no requirieron purificación adicional. Los compuestos **32-34** se obtuvieron con rendimientos del 80-90% (Tabla 8).

Tabla 8. Síntesis de 3-(((4-((4-arilpirimidin-2-il)amino)fenil)amino)metil)quinolin-2(1*H*)-onas (**32-34**).



7.4. Bioensayos

Los compuestos analizados en este capítulo se evaluaron en un formato de alto rendimiento de 384 pocillos como se describe en detalles en la sección de metodología de esta tesis.

Se realizaron mediciones para SphK1 y SphK2, cuyas valores obtenidos se muestran en las Tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

7.5. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo han permitido obtener una nueva serie de inhibidores de las enzimas SphK1 y SphK2. Para este estudio se utilizó como estrategia para la búsqueda de nuevos inhibidores, el uso como estructura de partida de un conocido inhibidor de SphK1, eligiéndose en este caso a **SKI-II**. Un estudio racional basado en datos estructurales, en el cual se emplearon diversas técnicas de modelado molecular, ha permitido el diseño, la síntesis y la obtención de una nueva serie de inhibidores, algunos de ellos con una potente actividad biológica. Los compuestos **19a** y **20a** que son estructuralmente muy similares a **SKI-II** mostraron efectos inhibidores un poco más débiles que el compuesto de partida. Los resultados de modelización molecular muestran que pequeños cambios en la estructura de estos compuestos producen significativas modificaciones en las interacciones moleculares que estabilizan los diferentes complejos. Un nuevo estudio de modelización molecular, en este caso tomando como estructura de referencia a **PF-543**, permitió el diseño y la síntesis de otra serie de compuestos más activos incorporando nuevas cadenas concertantes entre las porciones de las cabezas polares y las colas hidrofóbicas. Entre los compuestos informados en este capítulo, las moléculas **25**, **26b**, **27b**, **32b** y **33b**, son las que mostraron las mejores actividades inhibitorias en la serie completa. Las técnicas combinadas de simulaciones de dinámica molecular y cálculos QTAIM han permitido obtener una información completa y detallada sobre las interacciones moleculares que estabilizan los diferentes complejos de los nuevos inhibidores. Esta información es sumamente útil para poder planificar que modificaciones y cambios estructurales podrían realizarse con el fin de aumentar la afinidad para este tipo de compuestos con SphK1 y por otro lado también es de gran ayuda para el diseño de nuevos inhibidores de esta enzima.

7.6. Referencias

(1) French, K. J.; Schrecengost, R. S.; Lee, B. D.; Zhuang, Y.; Smith, S. N.; Eberly, J. L.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5962–5969.

(2) French, K. J.; Upson, J. J.; Keller, S. N.; Zhuang, Y.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Antitumor Activity of Sphingosine Kinase Inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318* (2), 596–603.

(3) Wang, Z.; Min, X.; Xiao, S.-H.; Johnstone, S.; Romanow, W.; Meininger, D.; Xu, H.; Liu, J.; Dai, J.; An, S.; et al. Molecular Basis of Sphingosine Kinase 1 Substrate Recognition and Catalysis. *Structure* **2013**, *21* (5), 798–809.

(4) Gustin, D. J.; Li, Y.; Brown, M. L.; Min, X.; Schmitt, M. J.; Wanska, M.; Wang, X.; Connors, R.; Johnstone, S.; Cardozo, M.; et al. Structure Guided Design of a Series of Sphingosine Kinase (SphK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4608–4616.

(5) Wang, J.; Knapp, S.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Elkins, J. M. Crystal Structure of Sphingosine Kinase 1 with PF-543. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (12), 1329–1333.

(6) Byun, H.-S.; Pyne, S.; MacRitchie, N.; Pyne, N. J.; Bittman, R. Novel Sphingosine-Containing Analogues Selectively Inhibit Sphingosine Kinase (SK) Isozymes, Induce SK1 Proteasomal Degradation and Reduce DNA Synthesis in Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Medchemcomm* **2013**, *4* (10), 10.1039/C3MD00201B.

(7) Bader, R. F. W. Atoms in Molecules. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18* (1), 9–15.

(8) Yokota, S.; Taniguchi, Y.; Kihara, A.; Mitsutake, S.; Igarashi, Y. Asp177 in C4 Domain of Mouse Sphingosine Kinase 1a Is Important for the Sphingosine Recognition. *FEBS Lett.* **2004**, *578* (1), 106–110.

(9) Lima, S.; Milstien, S.; Spiegel, S. A Real-Time High-Throughput Fluorescence Assay for Sphingosine Kinases. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (7), 1525–1530.

(10) Seeliger, D.; de Groot, B. L. Ligand Docking and Binding Site Analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (5), 417–422.

(11) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

(12) Gohlke, H.; Kiel, C.; Case, D. A. Insights into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS Complexes. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330* (4), 891–913.

(13) Parthasarathi, R.; Subramanian, V.; Sathyamurthy, N. Hydrogen Bonding without Borders: An Atoms-in-Molecules Perspective. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (10), 3349–3351.

(14) Yesselman, J. D.; Horowitz, S.; Brooks 3rd, C. L.; Trievel, R. C. Frequent Side Chain Methyl Carbon-Oxygen Hydrogen Bonding in Proteins Revealed by Computational and Stereochemical Analysis of Neutron Structures. *Proteins* **2015**, *83* (3), 403–410.

(15) Kaur, R.; Kaur, P.; Sharma, S.; Singh, G.; Mehndiratta, S.; Bedi, P. M. S.; Nepali, K. Anti-Cancer Pyrimidines in Diverse Scaffolds: A Review of Patent Literature. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **2015**, *10* (1), 23–71.

(16) Park, H.; Shin, Y.; Choe, H.; Hong, S. Computational Design and Discovery of

Nanomolar Inhibitors of IκB Kinase β. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 337–348.

Capítulo 8
Conclusiones Generales

En este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado diferentes técnicas de modelado molecular que, combinadas con ensayos biológicos y síntesis de nuevos compuestos, permitieron llegar a una serie de conclusiones orientadas al desarrollo de nuevos compuestos con propiedades inhibitorias para SphK1.

Cabe destacar que en cada uno de los capítulos precedentes se han presentado las conclusiones obtenidas de manera detallada y por lo tanto, en este capítulo sólo se presentan aquellas consideradas más relevantes y generales.

En una primera etapa, se realizó un análisis estructural exhaustivo sobre la conformación general de la proteína y las diferentes interacciones que permiten la correcta unión de los ligandos dentro del sitio activo. Teniendo en cuenta que en la bibliografía solo se encuentran datos de las interacciones a nivel molecular presentes en las estructuras de rayos X de los complejos, es un importante aporte determinar el tipo, la fortaleza y la estabilidad de estas interacciones.

Se analizaron los 4 ligandos cristalizados juntos a la proteína, esfingosina (**Sph**) y 3 inhibidores ampliamente descriptos en bibliografía, **SKI-II**, **1v2** y **PF-543**. Cada uno mostró interacciones específicas, pero todos mantienen al menos una interacción con D178 o con D81, lo cual es lo esperado ya que estas dos interacciones son fundamentales para el anclaje de residuos dentro del sitio activo. Estos datos son muy importantes para comenzar a diseñar nuevos inhibidores, los cuales deberían tener, de ser posible, al menos una de estas interacciones. Por otra parte, el análisis de docking realizado utilizando los inhibidores cristalizados, demuestra que los programas elegidos para llevar a cabo esta tarea son los correctos, colocando a los ligandos en su precisa conformación dentro del sitio activo de la proteína.

Se realizó un cribado virtual el cual, luego de perfeccionar el modelo, permitió encontrar dos nuevos andamiajes estructurales que podrían funcionar como inhibidores de SphK1. El compuesto dihidrobenzo[*b*]pirimido[5,4-*f*]azepina (**2**) presentó una actividad IC_{50} = 12 μM, que si bien no es tan potente como **PF-543** (IC_{50} = 2 nM), hay que tener en cuenta que es muy activo para ser una estructura obtenida a partir de un screening primario, y por lo tanto es un buen punto de partida para intentar optimizar su estructura y así mejorar su capacidad inhibitoria.

Los resultados de modelado molecular indican que aquellas estructuras en las que es posible diferenciar la porción correspondiente a la cabeza catiónica y la cola hidrófoba, tienen más probabilidades de ser

buenos ligandos para el sitio activo de la SphK1. El estudio realizado demostró que para conseguir información más precisa sobre estos complejos moleculares, es necesario utilizar técnicas más específicas. El empleo de cálculos QTAIM posibilitó la descripción de las interacciones moleculares que estabilizan los diferentes complejos ligando-receptor y así sacar conclusiones con respecto a dos aspectos: por una parte, determinar porqué estos nuevos compuestos son menos activos que **PF-543** y por otro lado, determinar que parte de la molécula deberían reemplazase para obtener mejores resultados y por lo tanto inhibidores más potentes de SphK1.

Posteriormente al descubrimiento de estos dos nuevos andamiajes estructurales, se evaluó la actividad de estos compuestos frente a SphK2. A partir de ensayos biológicos y la ayuda de técnicas de modelado molecular, se logró diseñar y sintetizar dos nuevos compuestos activos y selectivos para SphK2, los compuestos **17** y **18**. Es particularmente interesante el compuesto **17**, el cual no tiene ningún efecto citotóxico y posee un potente efecto antiinflamatorio ya que inhibe la adhesión de células mononucleares al endotelio disfuncional. Dado que su actividad frente a SphK2 es solo moderada, no podemos afirmar que esta actividad antiinflamatoria sea ocasionada exclusivamente por la inhibición de SphK2.

Con el hallazgo de 3 nuevos inhibidores de SphK1 (compuestos **2-4**), se obtuvo un modelo teórico que permitió predecir la actividad de diferentes compuestos antes de su síntesis. Para esto se realizaron dos estudios con diferentes bases computacionales: análisis con QTAIM y estudio de propensión dinámica de los enlaces puentes de hidrógeno. El análisis de QTAIM no solo permitió identificar y cuantificar cada interacción entre el ligando y su receptor a través de los valores de densidad electrónica $\rho(r)$, sino que también se pudieron utilizar estos valores como descriptores moleculares y por medio de un análisis estadístico de los mismos obtener una excelente correlacion entre los datos experimentales y teóricos. Por su parte, el estudio de propensión dinámica, que es una metodología bastante simple y con bajos requerimientos computacionales, dio resultados en excelente acuerdo con los datos experimentales, siendo una gran herramienta a la hora de predecir la actividad inhibitoria contra SphK1.

Por último, el capítulo final de esta tesis detalla cómo se realizó un diseño racional de drogas partiendo de un inhibidor conocido (**SKI-II**). Se logró diseñar, sintetizar y medir biológicamente la actividad de 32 compuestos, de los cuales 10 muestran actividades del orden μM contra SphK. El inhibidor más potente y también selectivo para SphK1 es el compuesto **27b**, el cual presenta un IC_{50} = 4,2 μM.

En resumen, en esta tesis se consiguió:

- Estudiar profundamente la estructura de la proteína, así como su sitio activo y los ligando cristalizados en la misma.

- Diseñar, sintetizar y medir biológicamente la actividad de 3 nuevos inhibidores para SphK1, partiendo de un cribado virtual. Seguidamente, determinar cuáles serían las modificaciones a realizar sobre estos nuevos inhibidores para permitir un mejor desempeño de los mismos.
- Diseñar un sistema por homología para SphK2, la cual no cuenta con datos cristalográficos.
- Diseñar, sintetizar y medir biológicamente la actividad de 2 nuevos inhibidores selectivos para SphK2, uno de los cuales presenta una baja citotoxicidad y una alta actividad antiinfamatoria.
- Diseñar y poner a punto dos técnicas computacionales que presentan una alta correlación con datos experimentales, permitiendo la predicción de la actividad contra SphK de moléculas no sintetizadas.
- Diseñar racionalmente inhibidores de SphK a partir de la estructura de un conocido inhibidor de SphK con actividades μM. Para esto, se valió de múltiples técnicas de modelado molecular.
- Sintetizar un total de 50 compuestos de los cuales más de 15 presentan actividades μM frente a SphKs.

Por último, nuestros resultados indican que los residuos D81 y D178 son de gran importancia para obtener una buena actividad inhibitoria y constituyen un punto de partida para la obtención de inhibidores más específicos que potencialmente puedan ser usados en el tratamiento de desórdenes inmunes o tumorales relacionados a la desregulación de la SphK.

European Journal of Medicinal Chemistry 139 (2017) 461–481

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

An integrative study to identify novel scaffolds for sphingosine kinase 1 inhibitors

Marcela Vettorazzi [a], Emilio Angelina [b], Santiago Lima [c], Tomas Gonec [d], Jan Otevrel [d], Pavlina Marvanova [d], Tereza Padrtova [d], Petr Mokry [d], Pavel Bobal [d], Lina M. Acosta [e], Alirio Palma [e], Justo Cobo [f], Janette Bobalova [g], Jozef Csollei [d, h], Ivan Malik [h], Sergio Alvarez [a], Sarah Spiegel [c], Josef Jampilek [h], Ricardo D. Enriz [a, *]

[a] Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL), Chacabuco 915, 5700 San Luis, Argentina
[b] Laboratorio de Estructura Molecular y Propiedades, Área de Química Física, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Avda. Libertad 5460, 3400 Corrientes, Argentina
[c] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Virginia Commonwealth University School of Medicine, Richmond, VA 23298 USA
[d] Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1, 612 42 Brno, Czech Republic
[e] Laboratorio de Síntesis Orgánica, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27, Calle 9, A.A 678, Bucaramanga, Colombia
[f] Inorganic and Organic Department, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén, Spain
[g] Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, v. v. i., Veveri 97, 602 00 Brno, Czech Republic
[h] Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojarov 10, 83232 Bratislava, Slovakia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 April 2017
Received in revised form
2 August 2017
Accepted 5 August 2017
Available online 10 August 2017

Keywords:
Sphingosine kinase 1 inhibitors
Virtual screening
Synthesis
Bioassays
Molecular modelling

ABSTRACT

Sphingosine kinase 1 (SphK1), the enzyme that produces the bioactive sphingolipid metabolite, sphingosine-1-phosphate, is a promising new molecular target for therapeutic intervention in cancer and inflammatory diseases. In view of its importance, the main objective of this work was to find new and more potent inhibitors for this enzyme possessing different structural scaffolds than those of the known inhibitors. Our theoretical and experimental study has allowed us to identify two new structural scaffolds (three new compounds), which could be used as starting structures for the design and then the development of new inhibitors of SphK1. Our study was carried out in different steps: virtual screening, synthesis, bioassays and molecular modelling. From our results, we propose a new dihydrobenzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine and two alkyl{3-/4-[1-hydroxy-2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl}carbamates as initial structures for the development of new inhibitors. In addition, our molecular modelling study using QTAIM calculations, allowed us to describe in detail the molecular interactions that stabilize the different Ligand-Receptor complexes. Such analyses indicate that the cationic head of the different compounds must be refined in order to obtain an increase in the binding affinity of these ligands.

1. Introduction

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid metabolite that regulates many physiological functions [1–3]; however, it also has a pathological role in autoimmune dysfunction, inflammation, cancer and many other diseases [4–6]. S1P is generated intracellularly by the action of two sphingosine kinases (SphKs) named SphK1 and SphK2, which catalyze the ATP-dependent phosphorylation of sphingosine on its primary hydroxyl group.

It has been demonstrated that S1P levels and SphK1 expression and/or activity are increased in distinct cancer types, including solid tumors of the breast, colon, lung, ovary, stomach, uterus, kidney, liver, and melanoma and in leukemia, among others [7–9]. Moreover, upregulation of SphK1 has been associated with tumor angiogenesis and lymphangiogenesis [10–13] and correlates with poor prognosis in cancer patients [14,15]. Indeed, substantial evidence indicates that pharmacological or molecular inhibition of SphK1 has anti-cancer effects [11,16–25]. Thus, it is clear that SphK1 is a promising novel molecular target for therapeutic

* Corresponding author.
E-mail address: denriz@unsl.edu.ar (R.D. Enriz).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.017
0223-5234/

intervention in cancer and inflammatory diseases [26,27].

The first crystal structure of SphK1 was reported in 2013 [28]. More recently two SphK1-co-crystal structures (4l02 and 4v24) with potent inhibitory compounds have also been published [29,30]. These structures provide useful structural information on the interactions of ligands at the active site of SphK1.

Previously, various compounds have been reported with inhibitory activity on SphK1 [29,31–37]. The structural scaffolding of the best known compounds is shown in Fig. 1, with their respective references. Among these compounds, compound SLP7111228 has been recently reported [37]. Recently, the crystal structure of SphK1 with PF-543, the most potent and selective SphK1 inhibitor, was also revealed [30,36]. While numerous non-specific and several isozyme-specific inhibitors of SphK1 have been studied, considering the important role of this enzyme in inflammatory processes related to cancer [38–41], an important task is to develop new and more potent SphK1 inhibitors based on different structural scaffolds than those of the known inhibitors. Thus, the main objective of this work is to obtain new SphK1 inhibitors having a different structural basis than the well-known inhibitors. In the first step of our study, which was based on the crystal structures of SphK1 alone [28] and complexed with an inhibitor [29,30], we have carried out virtual screening that allowed us to identify potential new inhibitors. Next, we synthesized and tested the inhibitory activity of these novel compounds, and finally, we conducted a molecular modelling study that allowed us to understand interactions at the molecular level that stabilize the formation of different Ligand-Receptor (L-R) complexes. Fig. 2 shows in schematic form the various steps that have been carried out in this study.

2. Results and discussion

2.1. Structure-based virtual screening

Structure-Based Virtual Screening (SBVS) strategies rely on the three dimensional structure of a target and on the ability of docking algorithms to predict the binding mode and the binding affinities of different compounds obtained from libraries [42]. The docking process is usually divided into two major steps: first, the correct placement of the ligand at the protein binding-site; and then estimation of the ligand affinity by a scoring function [43].

Before undertaking the prospective Virtual Screening (VS) campaigns to search for novel inhibitors of SphK1, we considered it prudent to evaluate the performance of the docking algorithm in retrieving known inhibitors of SphK1 from a decoys library. There are two treatments for constructing these libraries. In the most common approach a few active compounds are seed in a larger database of randomly selected (and supposedly inactive) molecules with similar physico-chemical properties but dissimilar 2-D topologies. However, in real medicinal chemistry pipelines, molecules are often congeneric as they come from parallel synthesis and, consequently, are structurally more similar to one another. It would therefore be more reasonable to select decoys according to their similarity to the active molecules [44]. We constructed the decoy library to evaluate docking performance by following this second approach. Since in this approach decoys are more likely to be actives than the randomly selected molecules, one needs to be sure that they are truly inactive. Therefore, their biological activities against the target of interest must be known. Accordingly, we have

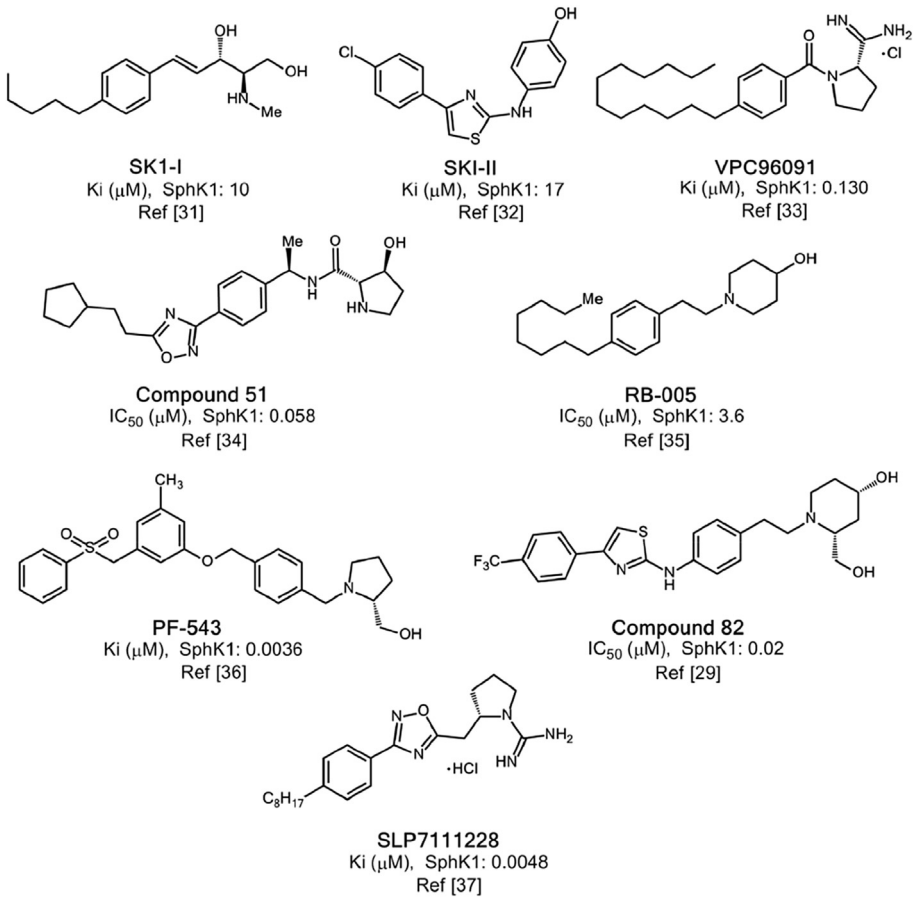


Fig. 1. Main structural scaffolds previously reported for inhibitors of SphK1.

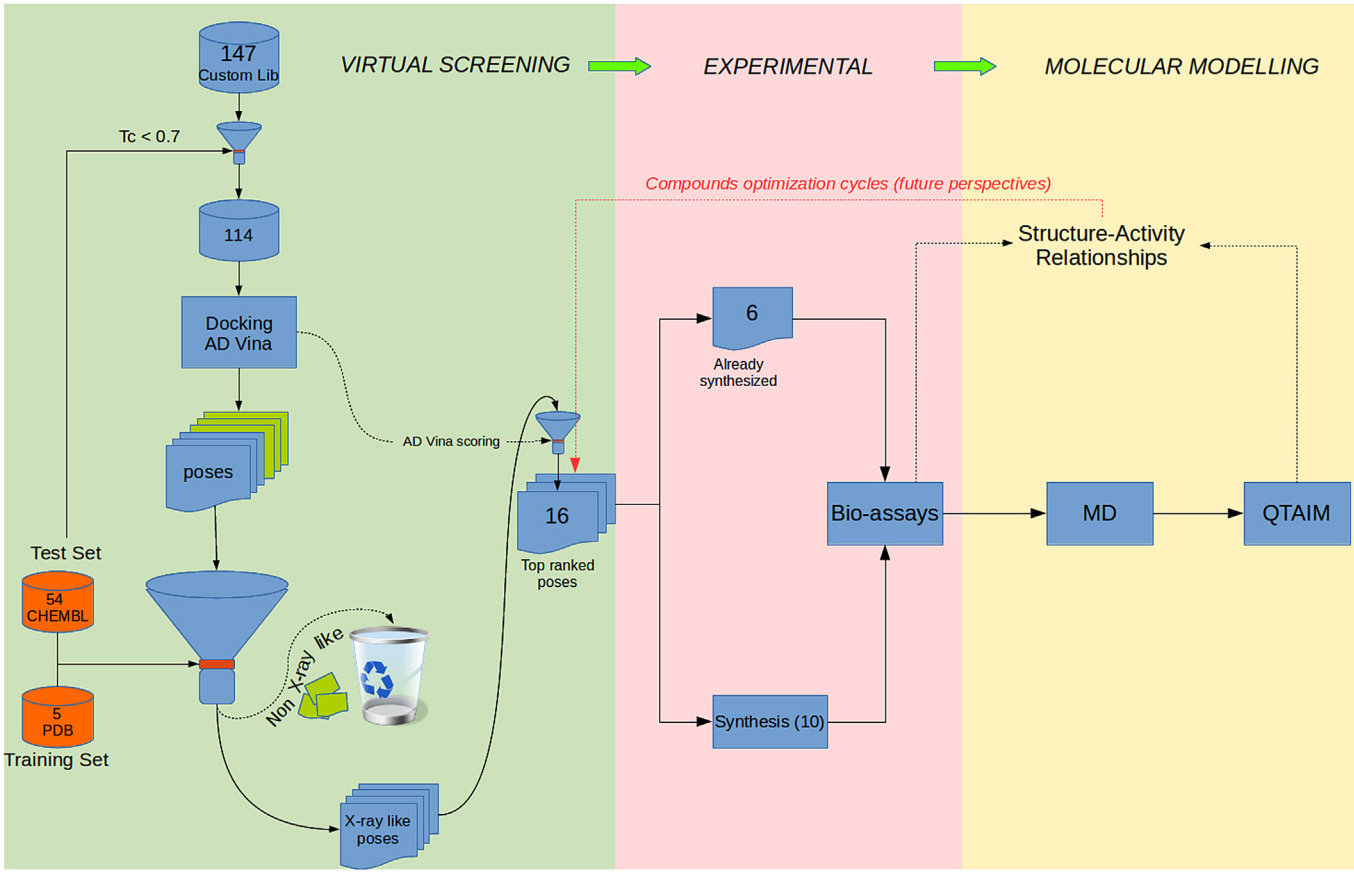


Fig. 2. Flow chart showing the various steps and techniques carried out in our study. The numbers inside the boxes indicate the number of compounds evaluated.

compiled a dataset of 54 compounds from CHEMBL (www.ebi.ac.uk/chembl/) [45] for which their experimentally measured dissociation constants (Ki values) against SphK1 are known. The compounds were sorted from the most actives to the marginally active ones according to their Ki values. The cutoff was set to 10000 nM, compounds above (below) this threshold were flagged as active (inactive). The chosen cutoff value ensures a balanced population of active/inactive compounds.

After screening the library with AutoDock Vina (AD Vina) [46] we constructed a Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) to asses the quality of the docking results [44]. Then the ROC curve was constructed by plotting the True Positive Rate (or Sensitivity) versus the False Positive Rate (or 1-Specificity) calculated at intervals over the ordered list of docking scores. The ROC is depicted in Fig. 3 for VS results on one of the experimentally solved SphK1 protein conformers, 3vzd_A_chainA (see cross-docking section below for details on protein conformers naming). In this graphic, the 45° diagonal (gray line) represents a random classification of the database with area under the curve (AUC) for the random case of 0.5. Any model with an AUC >0.5 performs better than random in discriminating the most active compounds from less active ones. As observed in the figure, the docking model performs very well in the classification of the dataset (AUC = 0.87). Similar results were obtained for the remaining available SphK1 structures.

Fig. 4a shows the best score pose for the 54 known inhibitors of SphK1 as docked in the same protein conformer 3vzd_A_chainB. While there is no structural information on how these inhibitors actually bind to SphK1, they share the same structural scaffolds as the four ligands in the solved structures and therefore, it is assumed that they will bind also in the same binding mode. As depicted in Fig. 4, most of the inhibitors adopt the characteristic J-shaped binding mode observed for the crystallographic ligands. However, some outliers can be observed among the poses: some of them do not enter entirely into the J-shaped cavity overlapping with the ADP binding site and some other ligands are turned over, i.e. with their polar heads anchored at the bottom and the hydrophobic tail

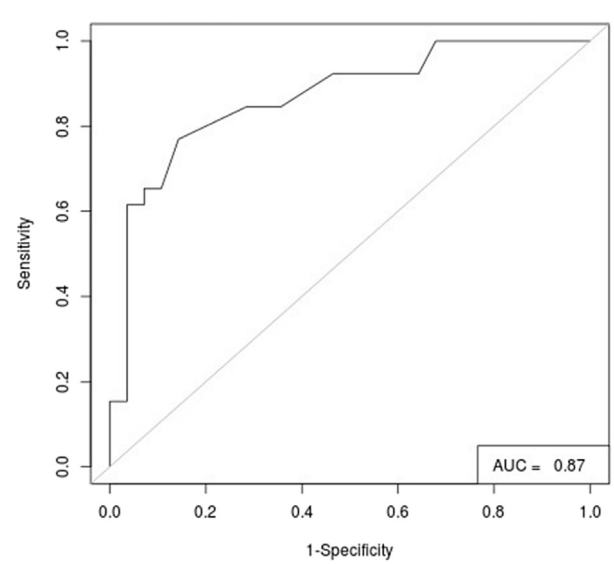


Fig. 3. Performance for the docking of the 54 known inhibitors of SphK1 on the conformer 3vzd_A_chainB.

near the entrance of the J-shaped cavity.

Therefore, although the AD Vina scoring function performs well in discriminating between more active and less active ligands, the ability of the docking algorithm in retrieving the correct ligand poses is somewhat deficient.

2.1.1. Cross-docking

Many studies have assessed the success rate of programs in self-docking tests, whereby a ligand is docked into the protein structure from which it was extracted (native docking). Cross-docking, or using a protein structure from a complex containing a different ligand, provides a more realistic assessment of a docking program's ability to reproduce X-ray results [47].

To evaluate the ability of the docking algorithm to retrieve the correct poses of known binders of SphK1, we performed a cross-docking analysis of the crystallographic complexes of SphK1 available to date. Currently, there are five SphK1 crystal structures deposited in the Protein Data Bank shown in Fig. 5a. In one, SphK1 was crystallized both in apo form (code 3vzb, chain C) and in complex with a substrate sphingosine-like lipid SQS (code 3vzb, chains A, B). In the remaining structures, SphK1 was solved in complex with a moderate, non-isozyme-specific inhibitor SKI-II in presence of ADP (3vzd) and without ADP (code 3vzc) and complexed with two potent inhibitors, PF543 (code 4v24) and 1V2 (code 4l02).

Four of the structures, 3vzb, 3vzd, 4l02 and 4v24 displayed both "A" and "B" alternative conformations for some residues. Since none of the residues with alternate conformations were close to the substrate cavity, only conformation "A" of those structures was kept. Moreover, while SphK1 is monomeric (biological assembly), the asymmetric unit in the crystal structures contains from 2 to 5 molecules (chains) depending on the structure (see Fig. 5a). Since the asymmetric unit constitutes the smallest repetitive portion of the crystal and due to the different stoichiometry of the chains within the same structure (i.e. apo form, bound to ligand, bound to ligand + ADP, see Fig. 5a), structural differences can be observed among the chains in a single crystal structure. In 19 out of the 20 SphK1 chains or conformers, there was a ligand bound to the substrate cavity in the C-terminal domain. Therefore, we performed cross-docking of the 19 ligands against the 20 conformations of proteins from the five crystal structures.

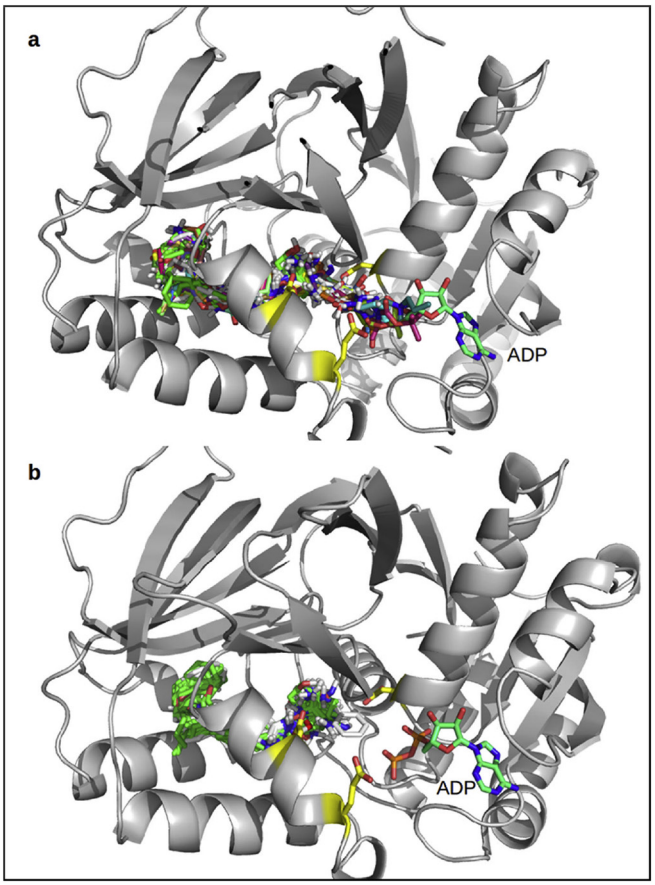


Fig. 4. Binding modes of the 54 known inhibitors of SphK1 before (a) and after (b) the filtering out of the non-structure-like poses.

For the naming of the different SphK1 conformers, we adopted the following convention: "PDB id_X_chainY", where PDB id is the four digit code with which the 3D structure is deposited in the Protein Data Bank; X the alternate conformation (i.e: A, B, etc); and Y corresponds to the protein chain (chain A, chain B, etc).

Previous to the cross-docking calculations, the twenty SphK1 conformers were superimposed by their protein alpha carbons. Then, each ligand from each chain in the crystal structures was cross-docked against all of the protein conformers. After docking, the RMSD was calculated between the experimental binding mode of each ligand conformer and its docked pose in each one of the twenty protein conformers. The binary heatmap in Fig. 5b summarizes the results of the cross-docking experiment.

As can be seen, PF543 and 1V2 are docked in the proposed experimental binding pose in most of the protein conformers. On the other hand, SKI-II and SQS in general reproduces the experimental pose only in its native conformers and/or in a smaller subset of protein conformers.

The poor performance of the cross-docking of SQS and SKI-II into their non-native conformers suggests that conformational changes might take place in the enzyme that are driven by the ligand characteristics (induced fit effects). This is also evidenced by the fact that none of the ligands dock well in the apo form of the enzyme (molecule C from 3vzb).

Examination of the apo form (molecule C of 3vzb) revealed a similarly shaped cavity with a comparable entrance around the head group in comparison with the holo enzyme, i.e. the J-shaped cavity already exists in the apo form. However, its solvent-accessible volume decreased markedly on going from the apo to the holo form due to the inward movement of helices α7 and α8 (Fig. 6a). As suggested by Wang et al. [28], the α7-α8 segment in SphKs might act like a lipid gate that controls the in-and-out of lipid substrate and product.

The SQS-bound enzyme superimposed to the SKI-II-bound, which illustrates the importance of the conformational changes of SphK1, is shown in Fig. 6b. As can be seen, the "α7-α8 gate" shows a slightly different conformation in SKI-II-bound (green) and SQS-bound conformers (orange). As a consequence of this conformational difference, when SKI-II is docked into the SQS-bound protein conformer, it cannot approach close enough to the α8 helix to form the N-H···O H-bond with Thr196 because Val177 would be located too close to the aminophenol ring of SKI-II leading to steric hindrance. The inability of SKI-II to form that H-bond in the SQS-bound protein conformer, which is present in the SKI-II-bound native structure, might explain in part the poor performance of the cross-docking of SKI-II. Thus, the conformational changes in the α7-α8 segment, and the fact that the docking performance is very sensitive to those changes, highlight the necessity of employing an ensemble of protein conformers in the virtual screening campaigns against SphK1.

2.1.2. Ensemble docking

In ensemble docking, the ligand is docked against a number of

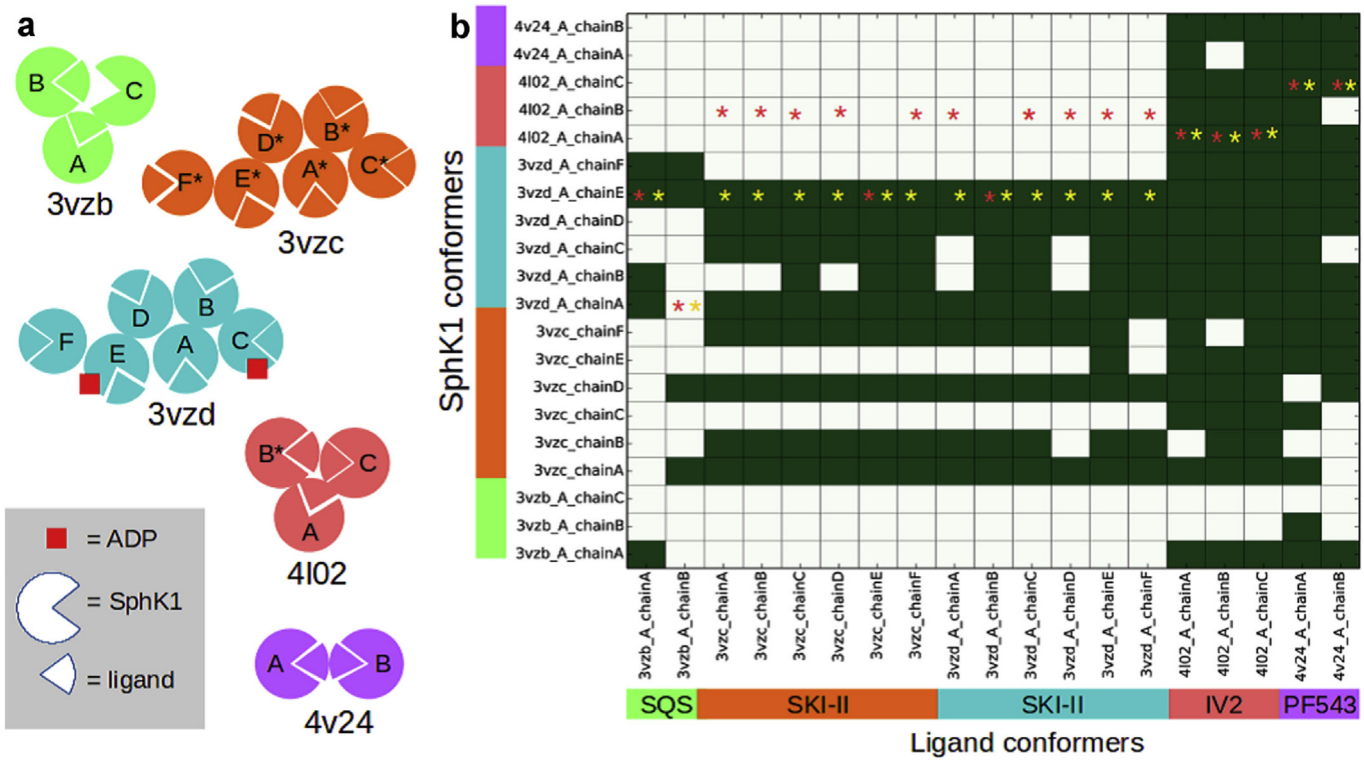


Fig. 5. (a) Schematic representation of the 5 crystal structures available for SphK1. This scheme is intended to illustrate the number and arrangement of the chains within each structure as well as the composition stoichiometry of each chain (ligand-bound/unbound, ADP-bound/unbound states). In structures 3vzb, 4l02 and 4v24 the ligand binding sites from each chain are packed against each other, while in structures 3vzc and 3vzd, the binding sites point outward from the asymmetric unit. Chains labeled with a star lack some residues in the loop that connect helices α7 and α8 (see below). (b) Performance of the cross-docking experiment. Top-ranked docking poses with a RMSD ≤2 with respect to the crystallographic binding mode in each chain are depicted in green. Red and yellow stars indicate the best scored protein conformer for each ligand before and after filtering out the "non X-ray like", respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

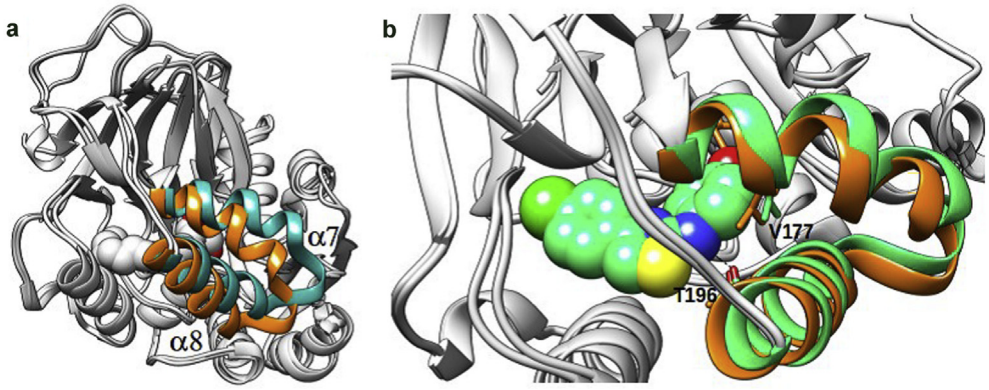


Fig. 6. (a) Crystal structure of SphK1 bound to SQS (in orange) superimposed to the apo form of the enzyme (in cyan). (b) Crystal structure of the SQS bound SphK1 (in orange) superimposed to the X-ray structure of the SKI-II bound enzyme (in green). SKI-II atoms are represented with spheres to highlight the steric hindrance with V177 from the SQS-bound protein conformer. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

conformations of the protein. The highest scoring binding mode is then selected from the ensemble of dockings against all protein conformers. Accordingly, we selected the highest scoring pose obtained for each one of the 19 ligands, which are labeled with a red star on the binary heat map in Fig. 5b. As can be seen in that figure, only in 8 of the 19 ligands (42% of the cases) was a correct pose (i.e. a pose with RMSD ≤ 2 Å) selected by the standard scoring function of AD Vina [46]. Thus, it is evident that an ensemble docking campaign to find novel inhibitors of SphK1 would likely fail if the "non X-ray like" (i.e. the poses with RMSD > 2 Å) are not first filtered out from the ensemble.

2.1.3. Model to filter out the "non X-ray like"

Taking advantage of the structural information available for SphK1, we trained a classification model that was able to distinguish the docking "X-ray like" from the "non X-ray like" according to a 2 Å RMSD cutoff, with ~86% accuracy on the training set. Fig. 7a shows the form of the logistic regression hypothesis $h_\theta(X)$ where X and θ are vectors containing the independent variables (or features) and the adjustable parameters of the model, respectively. The

model, once the parameters were adjusted, estimated the probability (between 0 and 1) of the docking pose being a crystal structure-like pose or a "X-ray like" pose, based on the ligand binding modes from the experimentally resolved structures of SphK1.

The features that fit the model were selected from the conformation-dependent terms defined in the AD Vina scoring function. The conformation-dependent terms in the default AD Vina scoring function consist of three steric terms ($gauss_1$, $gauss_2$ and repulsion), a hydrogen bond term, and a hydrophobic term [46].

To make the features independent of the ligand size, each term was normalized by the number of heavy atoms of the ligand or heavy atom counts (HAC) so that the model might generalize to ligands other than the ones in the training set.

By plotting the size-independent AD Vina terms against each other, we found that the hydrophobic term was irrelevant for discriminating between "X-ray like" and "non X-ray like", so it was removed from the set of potential features for the classification model. The hydrophobic term accounts for the desolvation penalty due to ligand binding. Since both "X-ray like" and "non X-ray like" are quite buried into the protein core (see Fig. 4a), the hydrophobic term does not differ appreciably between both kinds of poses. From the remaining four conformation-dependent terms, a new set of features was constructed by taking into account the physical meaning of these terms and the knowledge gained from the experimentally solved structures of SphK1.

Fig. 7a shows the new set of features constructed from the original AD Vina terms. Thus, the three steric terms (previously normalized by the HAC) were added together in a single term x_1 based on the observation that these three terms together (i.e. the two gauss attractive terms for dispersion and the repulsive term) roughly behave like the van der Walls terms in force field based scoring functions (i.e. the 12-6 Lennard-Jones potential). The combined steric term (x_1), similarly to the van der Waals terms, might be considered as a measure of the shape complementarity between the ligand and the receptor binding cavity. In addition to x_1, x_2 represents the AD Vina hydrogen bonding term normalized by the heavy atom count. Finally, alternative hydrogen bonding term x_3 was constructed. Unlike x_2, x_3 discriminates between those interactions where the ligand acts as hydrogen bond donor and as hydrogen bond acceptor. Thus, x_3 computes the AD Vina hydrogen bonding function for the interactions involving ligand donor atoms (HBD) versus ligand acceptors atoms (HBA), each one normalized by the total number of ligand H-bond donor and acceptor atoms of the ligand, respectively.

In Fig. 7b, x_1 is plotted against x_2 with the "X-ray like" (≤2 Å RMSD) and "non X-ray like" (>2 Å RMSD) depicted with black crosses and yellow circles, respectively, and the decision boundary between them is depicted in blue. This decision boundary

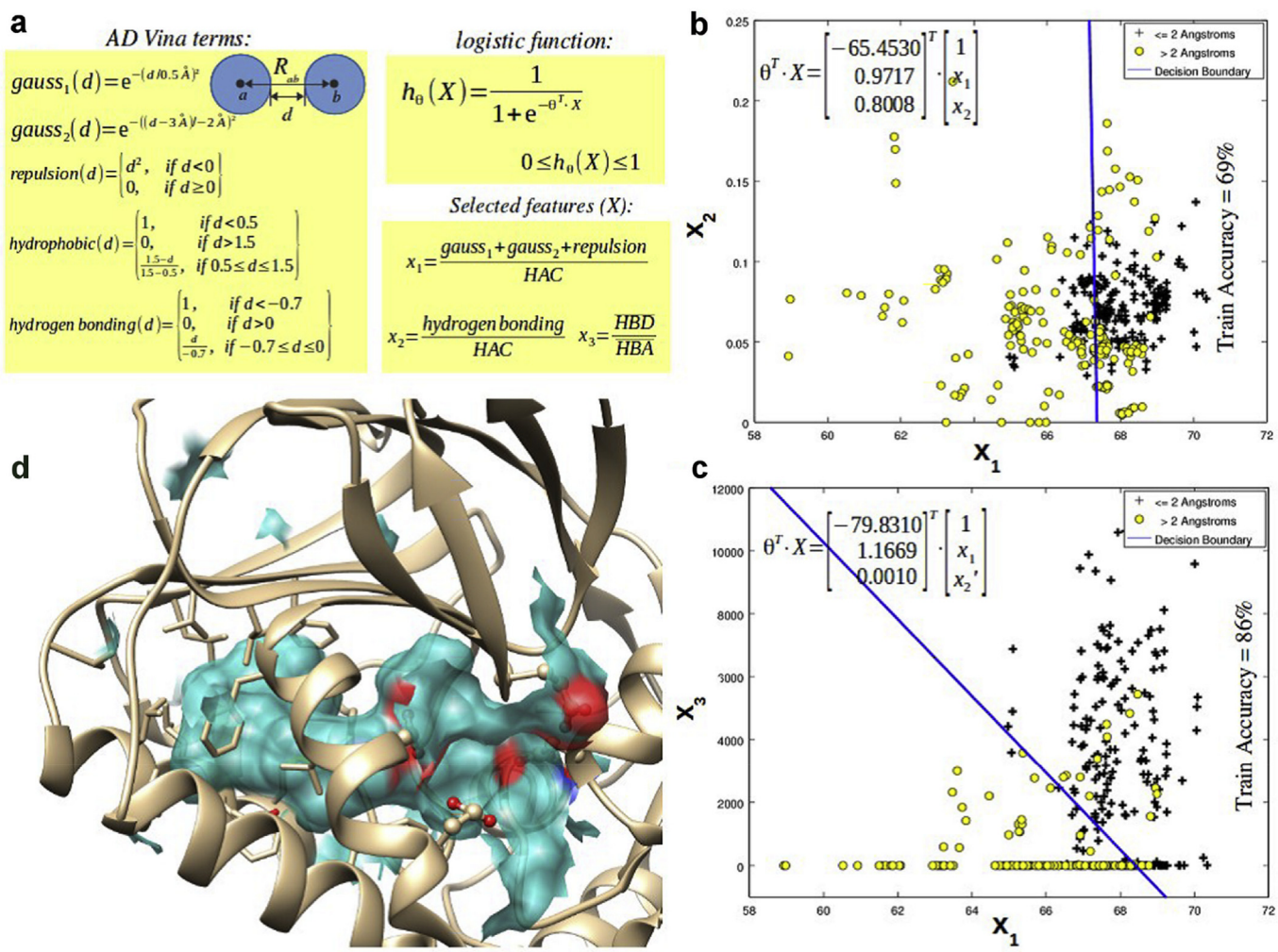


Fig. 7. Construction of the logistic regression model to classify docking poses in crystal structure-like/non crystal structure-like poses.

discriminates between both kinds of poses with 69% accuracy. On the other hand, when x_3 is used to fit the model instead of x_2 (Fig. 7c), the resulting decision boundary performs much better in discriminating between crystal-structure like and non-crystal structure-like poses. This improvement in the model performance is related to the simple observation that the ligands in the experimentally solved structures act almost exclusively as hydrogen bond donors against the enzyme residues. This results in a very high value of x_3 (and a very high HBD/HBA ratio) in the crystal structure-like poses and a very low value of x_3, allowing a better discrimination between both kinds of poses.

Fig. 7d depicts the J-shaped tunnel occupied by the ligand in the enzyme binding site. As can be seen, the borders of the J-shaped tunnel are defined mostly by hydrophobic residues and also by a set of negatively charged residues near the entrance of the tunnel, including Asp81 and Asp178 among others. Thus, the molecular recognition event involves *shape complementarity* between the ligand and SphK1 which is evidenced by the overall higher values of x_1 in the crystal structure-like poses and also *charge complementarity* which is better recovered by x_3.

The yellow stars in Fig. 5b show the highest scoring poses for each one of the 19 ligands after filtering out the "non X-ray like" with the trained logistic model. In 18 out of the 19 ligands a crystal structure-like pose was selected that represented a clear improvement as compared with the ensemble docking performance without applying the filter.

2.1.4. Model validation

In order to validate the trained classification model we applied it to the docked poses of the 54 known inhibitors of SphK1 from CHEMBL database to filter out the "non X-ray like". Fig. 4b shows the best scored poses for the protein conformer 3vzd_A_chainB, after applying the trained model. By visual inspection of Fig. 4b, one can actually see that most of the outlier poses were removed from the test set after filtering out the non-crystal structure-like poses.

2.1.5. Pre-selection of candidate compounds and results of the virtual screening

From the point of view of the structure, the compounds selected for further testing should bear some structural resemblance to the known ligands; i.e. have a polar head and a hydrophobic tail, as well as some conformational flexibility. Based on this, we selected a group of 147 compounds including chalcones, acetogenins, protoberberines, nitrosopyrimidines and carbamates among others. The fingerprints of these 147 compounds were calculated using Open Babel [48], a chemical expert system mainly used for converting chemical file formats, and the results were compared with fingerprints obtained for the 54 compounds used previously to test the model. Those compounds having a Tanimoto index (Tc) [43] greater than 0.7 were discarded. Note that the fingerprints are a way to encode the structure of a molecule in order to compare it with other compounds; whereas the Tc is a measure of the similarity between two structures ranging from 0 to 1. Based on the Tc index, we selected 114 structurally diverse compounds which possess structural differences with respect to the known binders from the test set, justifying their further study.

2.2. Chemistry

Our model predicted sixteen different compounds as potential inhibitors of SphK1 (Table 1) that were tested *in vitro* for inhibition of recombinant SphK1. Synthesis of compounds **2**–**12**, **14** and **15** have not been previously reported in the literature, and thus their characterization is now described (compounds **7**–**9** were reported only as moderate antimicrobial and/or antioxidant agents, but without their synthesis and analytical data [49–51]). Synthesis and characterization of compounds **1**, **13** and **16** have been previously reported [52–54].

Compound **2** was synthesized in two steps from synthetically available 4-chloro-6,11-dimethyl-6,11-dihydro-5H-benzo[*b*]pyrimido [5,4-f]azepine [52] by treatment with excess of hydrazine monohydrate and subsequent condensation of the resulted hydrazinyl derivative with *p*-chlorobenzaldehyde. Both the above precursor of compound **1** and compound **2** were prepared following the general procedure shown in Scheme 1, which starts from the corresponding 5-allyl-4,6-dichloropyrimidine that suffers aminolysis by reaction with a substituted N-methylaniline to afford the corresponding 5-allyl-4-arylamino-4-chloropyrimidine which under a strong acid media provokes intramolecular Friedel-Crafts cyclization to afford the corresponding 6,11–dihydro–5H–benzo [*b*]pyrimido [5,4–f]azepine; in the case of starting from *p*-methoxy-N-methylaniline, the demethylation of the methoxy group is observed in the cyclization step and so rendering the compound **1**.

Reagents and conditions: a) DIPEA, EtOH, reflux, 48–72 h; b) CH_3SO_3H, 115–120 °C, 10–20 min; c) $NH_2NH_2 \cdot H_2O$, EtOH, reflux, 24 h; d) *p*-chlorobenzaldehyde, EtOH, AcOH (cat.) reflux, 4 h.

Reaction of 3- or 4-aminoacetophenone and a suitable alkyl chloroformiate gave alkyl (3-/4-acetylphenyl)carbamates **3a**–**6a**, which reacted with bromine in chloroform to yield alkyl [3-/4-(bromoacetyl)phenyl]carbamates **3b**–**6b**; these compounds by treatment with different *N*-monosubstituted aryl(heteroaryl)piperazines provided the corresponding alkyl {3-/4-[(4-aryl(heteroaryl)piperazin-1-yl)acetyl]phenyl}carbamates **3c**–**6c**. Subsequent reduction of keto group using $NaBH_4$ provided target alkyl {3-/4-[1-hydroxy-2-(4-aryl(heteroaryl)piperazin-1-yl) ethyl] phenyl}carbamates **3**–**6**, see Scheme 2.

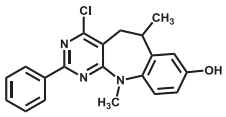
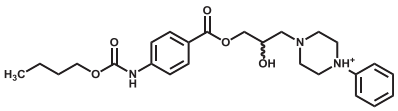
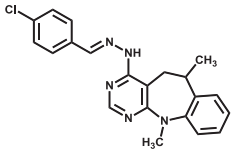
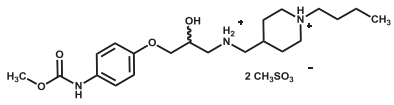
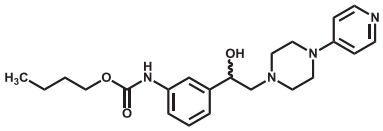
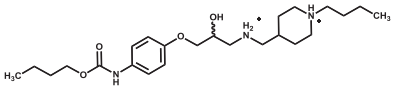
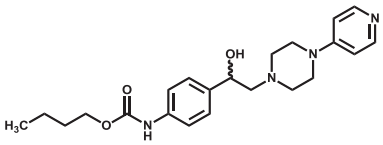
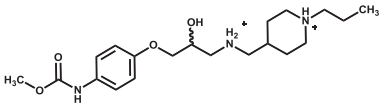
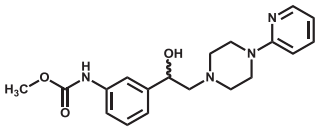
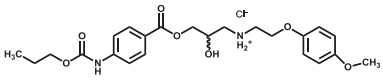
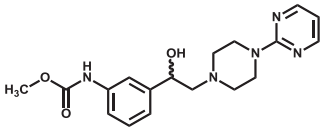
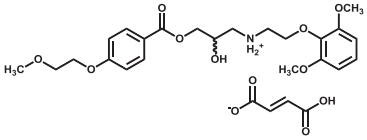
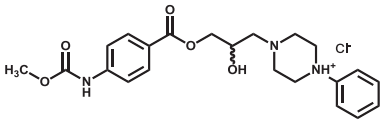
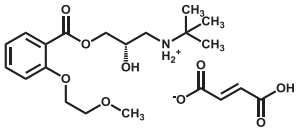
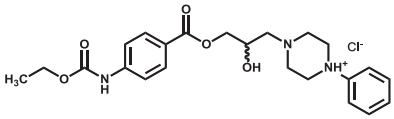
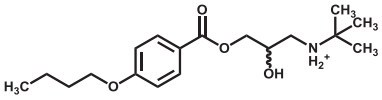
Reagents and conditions: a) $ClCOOR^1$, pyridine, acetone, reflux 3 h; b) Br_2, $CHCl_3$, ambient temperature 3 h; c) *N*-(hetero)arylpiperazine, TEA, THF, ambient temperature 3 h; d) $NaBH_4$, MeOH, reflux 3 h.

Studied 1-(3-{4-[(alkoxycarbonyl)amino]benzoyloxy}-2-hydroxypropyl)-4-phenylpiperazin-1-ium chlorides **7**–**9** were prepared by multiple-step reaction described in Scheme 3. Epoxides **7a**–**9a** and **13a** (see below) were prepared from 4-aminobenzoic acid through reaction with methyl, ethyl, propyl and butyl chloroformiates giving appropriate 4-[(alkoxycarbonyl) amino]benzoic acids. Chlorides of these acids formed by thionyl chloride treatment gave desired epoxides **7a**–**9a** and **13a** after reaction with 2,3-epoxypropan-1-ol [53]. In the last step final compounds **7**–**9** were prepared by a reaction of the epoxides with 1-(4-phenyl)piperazine and then converted to the hydrochloride salts using ethereal HCl to enhance their solubility in water [55].

Reagents and conditions: a) ClCOOR, pyridine, acetone, reflux 3 h; b) $SOCl_2$, toluene, reflux; c) 2,3-epoxypropan-1-ol, THF, TEA, 0 °C then ambient temperature; d) 1-phenylpiperazine, *i*-PrOH, reflux; e) HCl, Et_2O, ambient temperature.

(1-Butylpiperidin-4-yl)methanamine (**10b**=**11b**) and (1-propylpiperidin-4-yl)methanamine (**12b**) were prepared according to the literature from piperidine-4-carboxamide by alkylation followed by reduction [56,57]. The preparation of target products **10**–**12** was conducted as follows: the commercially available 4-aminophenol was treated with alkyl chloroformates (R^1 = Me, Bu) followed by epichlorohydrin addition to give requisite methyl [4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl]carbamate (**10a**=**12a**) and butyl [4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl]carbamate (**11a**) [58]. The carbamates were then coupled to previously prepared methanamines in MeOH at ambient temperature. The prepared final products as free bases were transformed to target 4-{[(2-hydroxy-3-{4-[(alkoxycarbonyl)amino]phenoxy}propyl)azaniumyl]methyl}-1-

Table 1
Structural features of compounds evaluated as SphK1 inhibitors.

Comp.	Structure	Comp.	Structure
1		**9**	
2		**10**	
3		**11**	
4		**12**	
5		**13**	
6		**14**	
7		**15**	
8		**16**	

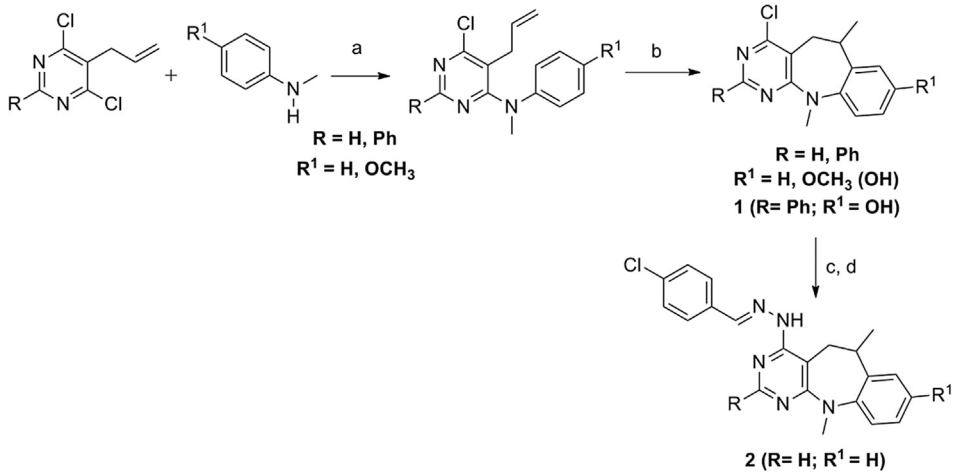
alkylpiperidin-1-ium dimethanesulfonates **10**–**12**, see Scheme 4.

Reagents and conditions: a) ClCOOR[1], Et_2O, pyridine, ambient temperature; b) 2-(chloromethyl)oxirane, Et_2O, KOH, ambient temperature; c) alkyl halides; d) $LiAlH_4$; e) MeOH, ambient temperature; f) CH_3SO_3H, acetone.

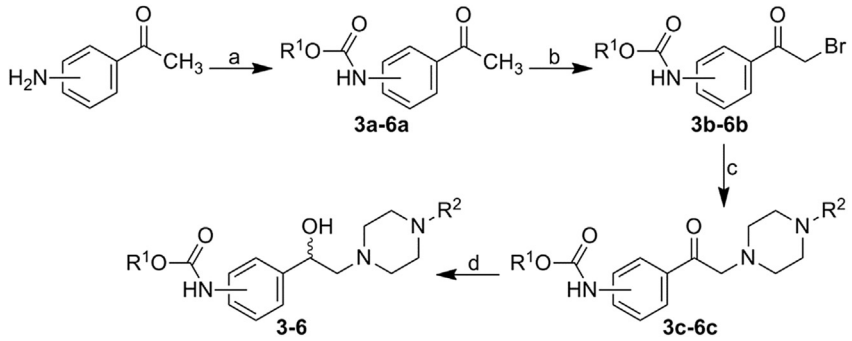
Synthesis of 2-hydroxy-3-[2-(4-methoxyphenoxy)ethylamino] propyl 4-(propoxycarbonylamino)benzoate hydrochloride (**13**) was described in Tengler et al. [53]. The first main intermediate, oxiran-2-ylmethyl 4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoate (**13a**) was synthesized according to Scheme 3. The epoxide ring was opened by addition of the second main intermediate, 2-(4-methoxyphenoxy) ethanamine (**13b**) prepared by Gabriel synthesis from 4-methoxyphenol via 1-(2-bromoethoxy)-4-methoxybenzene and 2-[2-(4-methoxyphenoxy)ethyl]-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione, see Scheme 5. The higher aqueous-soluble hydrochloride salt was prepared from the acquired base using ethereal HCl, as described in Tengler et al. [53].

Reagents and conditions: **13a** see Scheme 3; a) 1,2-dibromoethane, NaOH; b) potassium phtalimide, KI, DMF; c) $NH_2NH_2 \cdot H_2O$, EtOH; d) *i*-PrOH; e) HCl, Et_2O.

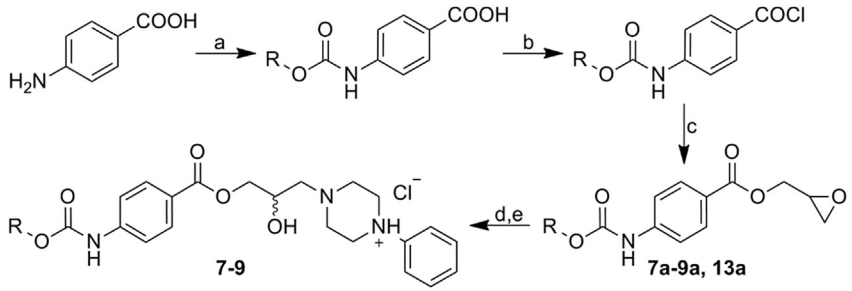
Final product **14** was prepared via multi-step synthesis as described in Scheme 6. Tosylate intermediates 2-methoxyethyl 4-methylbenzenesulfonate and oxiran-2-ylmethyl 4-methylbenzenesulfonate were prepared according to the published procedure by reaction of 4-methylbenzenesulfonyl chloride with 2-methoxyethanol and oxiran-2-ylmethanol, respectively, in dichloromethane [59,60]. 2-(2,6-Dimethoxyphenoxy)ethanamine was prepared via Gabriel synthesis (see Scheme 5) from 2-[2-(2,6-dimethoxyphenoxy)ethyl]-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione in two-step synthesis starting from 2,6-dimethoxyphenol that gave 2-(2-bromoethoxy)-1,3-dimethoxybenzene with 1,2-dibromoethane. Then the 2-(2-bromoethoxy)-1,3-dimethoxybenzene was reacted with potassium phthalimide [61]. The main synthesis was carried out as described by Marvanova et al. [62]. 4-(2-Methoxy)ethoxybenzoic acid (**14a**) was prepared from ethyl 4-hydroxybenzoate via reaction with 2-methoxyethyl 4-methylbenzenesulfonate and



Scheme 1. Synthesis of 4-chloro-6,11-dimethyl-6,11-dihydro-8-hydroxy-2-phenyl-5*H*-benzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine, (**1**) (R = Ph; R^1 = OH) [49] and (*E*)-4-(2-(4-chlorobenzylidene)hydrazinyl)-6,11-dimethyl-6,11-dihydro-5*H*-benzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine (**2**) (R = R^1 = H).



Scheme 2. Synthesis of alkyl {3-/4-[1-hydroxy-2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethyl] phenyl}carbamates **3**–**6**. R^1: 3-Me, 3-Bu, 4-Bu; R^2: pyridine-2-yl, pyridine-4-yl, pyrimidine-2-yl.



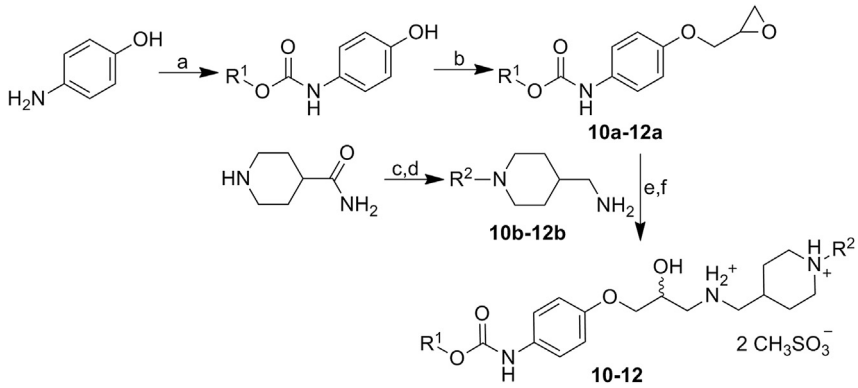
Scheme 3. Synthesis of studied 1-(3-{4-[(alkoxycarbonyl)amino]benzoyloxy}-2-hydroxypropyl)-4-phenylpiperazin-1-ium chlorides **7**–**9**. R: Me, Et, Bu and Pr (**13a**).

following hydrolysis of the ester. The final product, fumarate salt (**14**), was prepared from the potassium salt of acid **14a** that gave (oxiran-2-yl)methyl 4-(2-methoxyethoxy)benzoate (**14b**) after reaction with oxiran-2-ylmethyl 4-methylbenzenesulfonate. The oxirane ring was then opened by 2-(2,6-dimethoxyphenoxy) ethanamine. The obtained base was finally converted to its fumarate salt using ethereal solution of fumaric acid to enhance the solubility of the compounds in water.

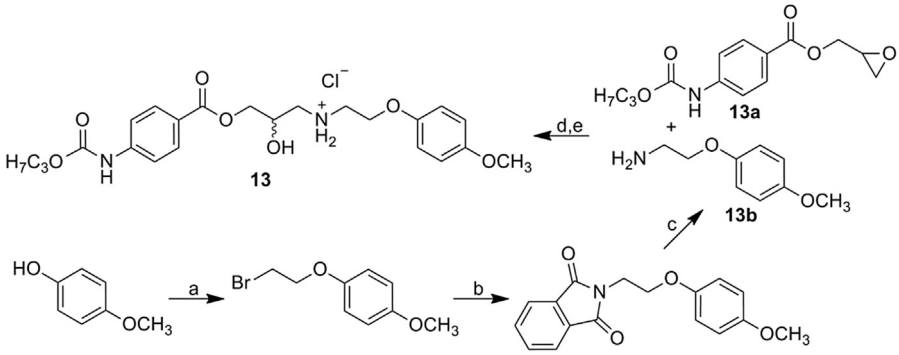
Reagents and conditions: a) 2-methoxyethyl 4-methylbenzenesulfonate, K_2CO_3, acetone, ambient temperature; b) *i*) NaOH, *ii*) HCl, $CHCl_3$; c) MeOH, *i*-PrOH, KOH; d) oxiran-2-ylmethyl 4-methylbenzenesulfonate, DMF, 7 h, 70 °C; e) 2-(2,6-dimethoxyphenoxy)ethanamine, *i*-PrOH, 1 h at 85 °C and for 72 h at ambient temperature; f) fumaric acid, Et_2O.

1-Chloro-2-methoxyethane by reaction with methyl 2-hydroxybenzoate gave methyl 2-(2-methoxyethoxy)benzoate (**15a**) that yielded acid **15b** after hydrolysis. A reaction of the acid with $SOCl_2$ provided 2-(2-methoxyethoxy)benzoyl chloride that with (2*S*)-oxiran-2-ylmethanol in the presence of 4-dimethylaminopyridine formed (2*R*)-oxiran-2-ylmethyl 2-(2-methoxyethoxy)benzoate (**15c**), a reaction of which with *tert*-butylamine resulted in the formation of (2*R*)-3-(*tert*-butylamino)-2-hydroxypropyl 2-(2-methoxyethoxy)benzoate that was converted to final fumarate salt **15**, see Scheme 7.

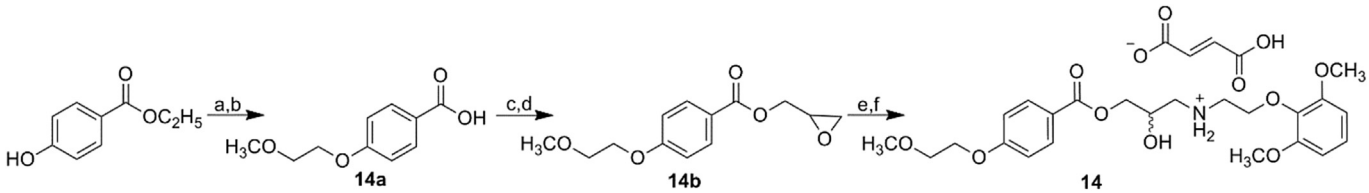
Reagents and conditions: a) 1-chloro-2-methoxyethane, K_2CO_3, KI, DMF, reflux, 6 h; b) *i*) NaOH, *ii*) HCl, CH_3Cl; c) $SOCl_2$, toluene; d) (2*S*)-oxiran-2-ylmethanol, DMAP, CH_2Cl_2; e) *tert*-butylamine, *i*-PrOH; f) fumaric acid, Et_2O.



Scheme 4. Synthesis of studied alkyl [4-(3-{[(1-alkylpiperidin-4-yl)methyl]amino}-2-hydroxypropoxy)phenyl]carbamate dimethanesulfonates **10**–**12**. R^1: Me, Bu; R^2: Pr, Bu.



Scheme 5. Synthesis of 2-hydroxy-3-[2-(4-methoxyphenoxy)ethylamino]propyl 4-(propoxycarbonylamino)benzoate hydrochloride (**13**).



Scheme 6. Synthesis of target [2-(2,6-dimethoxyfenoxy)ethyl]{2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethoxy)benzoyloxy]propyl} ammonium fumarate (**14**).

Target compound **16** was prepared by a multiple-step synthesis according to Scheme 8, as described in Tengler et al. [54]. Starting 4-butoxybenzoic acid was transformed to acid chloride that formed a suitable epoxide with 2,3-epoxypropan-1-ol. The epoxide was opened by reaction with *tert*-butylamine and gave 3-*tert*-butylamino-2-hydroxypropyl 4-butoxybenzoate. The obtained base was transformed to hydrochloride salt **16** with increased water solubility using ethereal HCl [54].

Reagents and conditions: a) toluene, PCl_5; b) 2,3-epoxypropan-1-ol, CH_2Cl_2; c) *tert*-butylamine, *i*-PrOH; d) HCl, Et_2O.

2.3. Binding affinities for sphingosine kinase 1 (bioassays)

Putative SphK1 inhibitors were evaluated in 384-well high-throughput format as described [63].

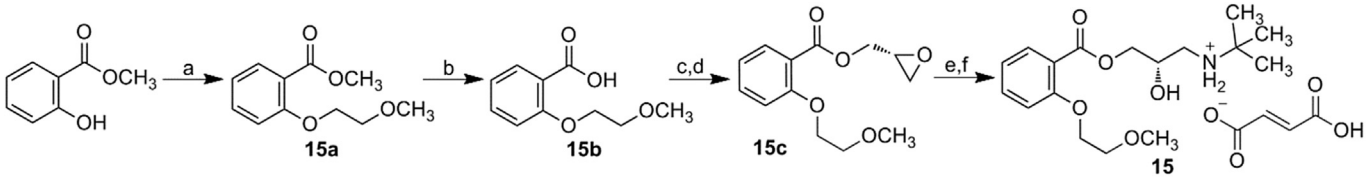
Only 3 of the 17 compounds predicted to be potential inhibitors of SphK1 using virtual screening showed activity as inhibitors (Fig. 8). One dihydrobenzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine (**2**) and two alkyl {3-/4-[1-hydroxy-2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethyl] phenyl}carbamates (**3** and **4**) were the compounds possessing significant inhibitory activities against SphK1; compound **2** had relatively strong inhibitory activity with an IC_{50} of 12 μM. While this inhibition was only moderate, it was considered significant for exploratory pre-screening.

2.4. Molecular modelling

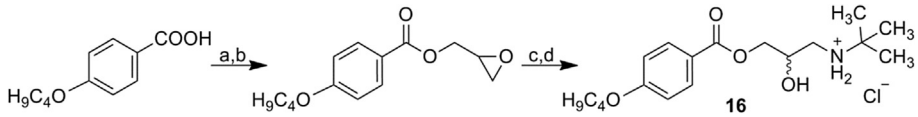
In order to examine why these compounds were much weaker inhibitors than **PF543**, one of the most potent SphK1 inhibitors reported so far [30,36], we next conducted a molecular modelling study in which we simulated the molecular interactions of the active compounds (**2, 3** and **4**) with SphK1 to analyze the different molecular interactions involved in the complexes of the new compounds with SphK1.

The main objective was to assess the molecular interactions that can stabilize and destabilize the different ligand-receptor complexes. We also included compound **PF543** in our molecular modelling study, which therefore allowed us to perform a comparative analysis of the different activities displayed for these molecules in relation to their structural differences.

The molecular modelling study was conducted in three different stages. In the first step we performed a docking analysis using the



Scheme 7. Synthesis of target [2-(2,6-dimethoxyfenoxy)ethyl]{2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethoxy)benzoyloxy]propyl} ammonium fumarate (**15**).



Scheme 8. Synthesis of 3-*tert*-butylamino-2-hydroxypropyl 4-butoxybenzoate hydrochloride (**16**).

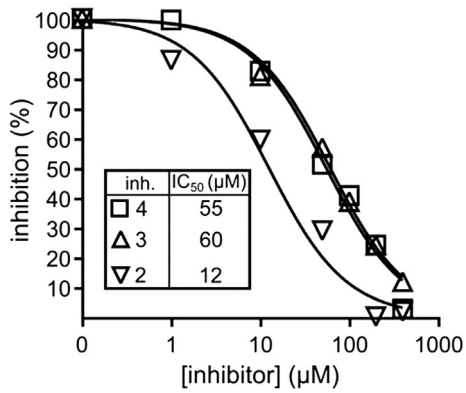


Fig. 8. SphK1 percent inhibition versus concentration plot for the compounds 2, 3 and 4.

Autodock program [64]. In the second stage of this study, we carried out molecular dynamics (MD) simulations using the AMBER software package [65]. From the trajectories obtained with the MD simulations, we performed an analysis per residue for the different compounds. Finally, to better understand the molecular interactions involved in the different L-R complexes, a Quantum Theory of Atoms In Molecules (QTAIM) study was carried out for the most representative structures of each complex. In previous work, we have demonstrated the importance of these QTAIM studies for understanding of the details of the different molecular interactions that stabilize or destabilize the various complexes [66–70].

From docking studies (although they might be considered exploratory and preliminary), it was already possible to see significant differences between **PF543** and some of the new compounds reported here. For **PF543**, the docking studies suggest that it binds in the well-known J-shaped pocket (polar head in the polar zone of the receptor and the hydrophobic tail at the hydrophobic areas) (Fig. 9a). The same result was obtained for compound **2** (Fig. 9b). In contrast, the docking analysis of compounds **4**, and **3** suggests that these compounds can bind in two ways: the known J form and in an inverted form in which the polar head interacts with the hydrophobic region of the acceptor and the hydrophobic tail is located at the polar region of the binding pocket (Fig. 9b and c). It is interesting to note that compound **2,** which possessed the strongest inhibitory effect among the compounds obtained here, binds to the active site only in the so-called correct form, the same as **PF543**.

Interesting results were also obtained from the molecular dynamics simulations. Analysis per residue obtained from such simulations allowed us to define the main interactions that stabilize the different complexes among the simulations (Fig. 10). In general, the active compounds studied here displayed their pharmacophoric portions in a closely related spatial form to that displayed by **PF543** [30] and other well-known inhibitors of SphK1 [28,29]. Consistent with previous experimental results [41,71,72], our simulations indicate the importance of the negatively charged D178, F192, L268 and F303 residues for binding of these ligands to SphK1 (Fig. 10). Superposition of interactions for compounds **2**, **4** and **3** with those displayed by **PF543** are shown in Fig. 10a–c. From this, it is evident that these compounds bind in a similar manner to **PF543** because they interact with essentially the same amino acids. However, these interactions are generally weaker than those shown for **PF543** along the simulations. These results are in agreement with the experimental data and might explain, at least in part, the lower inhibitory effects of the compounds reported here than **PF543**.

It is important to note that we are particularly interested in detecting and quantifying the interactions that stabilize and destabilize the formation of the inhibitor complexes with SphK1. While these interactions are mostly relatively weak, it is clear that molecular dynamics simulations are not accurate enough to compare with affinities observed experimentally.

Therefore, we decided to conduct a QTAIM study that can better quantify the molecular interactions obtained for the different complexes. We recently reported that the charge density value at the bond critical point ($\rho(r_b)$), which is a descriptor of the strength of the different bonds, can be used to quantify the affinity of a ligand to form a complex ligand-receptor [67,70]. We have analyzed the complexes obtained for the three compounds reported here **2, 3** and **4** using this type of analysis and also included compound **PF543** for comparison. For the sake of brevity, we only discuss the results obtained for compounds **PF543** and **2**, but similar results data were obtained for compounds **3** and **4**.

Fig. 11 shows the sum of the $\rho(r_b)$ values corresponding to the interactions of the polar head (blue bars) and the hydrophobic tail (orange bars) obtained for compounds **2** and **PF543**. The sum of the $\rho(r_b)$ values for all the interactions of one part of the inhibitor (i.e., the polar head or hydrophobic tail) provides a measure of the anchoring strength of each moiety of the inhibitor to the binding pocket. This clearly shows that the hydrophobic tail of compound **2** binds to SphK1 with similar strength to that observed for **PF543**. However, the anchoring through the polar head is much weaker for the new inhibitor than for **PF543**, which is more strongly anchored in the binding pocket (Fig. 11).

The strength and weakness of the different molecular interactions might be better appreciated in Fig. 12 which shows a

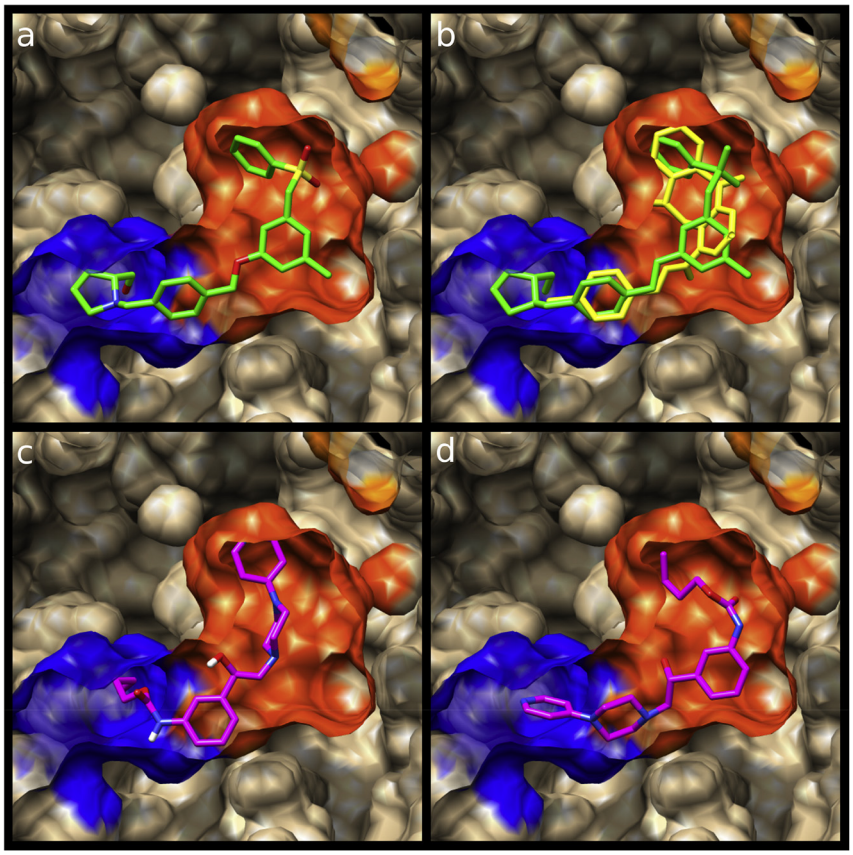


Fig. 9. Spatial view of the different ligands bonded in the binding pocket of SphK1. The blue and orange zones represent the cationic and hydrophobic portions of the active site, respectively. a) **PF543** (in green), b) **PF543** (in green) superimposed on compound **2** (in yellow). c) and d) compound **3** (in magenta) bonded in the two different ways. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

comparative analysis of the different interactions per residue. It should be noted that the strongest interaction for **PF543** is with D178 (denoted by a red arrow). It seems that a highly conserved aspartic acid is important for the binding of the ligands, indicating that the terminal carboxyl group may function as an anchoring point for molecules possessing strong inhibitory activity against SphK1 [28,71,72]. After 1.5 ns of MD simulations, the ligand has moved somewhat compared with its initial position; however, the strong interaction with D178 was maintained, supporting the suggestion that this aspartate residue might function as an anchoring point for this type of ligands. This interaction is not present in compound **2**. From these results it appears that introduction of structural changes to enhance this interaction might lead to more active inhibitors.

Fig. 9b shows a spatial overlap of compounds **2** and **PF543**. This figure clearly shows that the hydrophobic portions of both compounds superimposed very well and fit perfectly into the hydrophobic portion of the active site. However, it should be noted that compound **2** is shorter than **PF543**, and therefore cannot interact with Asp178 (the interatomic distance between the polar head **2** and Asp178 is about 8 Å).

We evaluated the different molecular interactions obtained for the complexes in detail using molecular graphs. We only discuss here the results obtained for compounds **PF543** and **2** (Fig. 13), but similar data were obtained for compounds **4** and **3** (Figs. S1 and S2 in supporting information). The molecular size of these complexes is large and therefore it is not possible to visualize in detail the different interactions that stabilize and destabilize such complexes and we focused on the different molecular interactions that take place in the cationic head of the ligands. It must be remarked that the molecular interactions observed at the hydrophobic tails of all the ligands are very similar in all the complexes studied here (not examined).

Fig. 13a shows the main interactions, A170, I174, D178, F192, L268 and G342, which stabilize the polar head of **PF543** complexed with SphK1. A bond critical point (BCP) and the corresponding bond paths that connect the protonated amine group of PF543 with the carboxylate group in D178 can be observed in the molecular graph of Fig. 13a. The local charge density value (ρb) at this BCP is 0.0415 a.u. which is on the border between a moderate to strong H-bond [73]. PF543 is also engaged to D178 through another moderate hydrogen bond O–H···O=CO ($\rho b = 0.0365$ a.u.) and two weak C–H···O=CO contacts ($\sum \rho b = 0.0129$ a.u.). Moreover, **PF543** also forms several intermolecular interactions with I174, most of them involving the primary alcohol of the inhibitor. All together, the interactions with I174 contribute in 0.03880 a.u. of charge density to the anchoring of PF543 at the enzyme cavity. Residue A170 at the back wall of the J-shaped cavity also contribute appreciably ($\sum \rho b = 0.0217$ a.u.) to the anchoring of **PF543** into the binding pocket (see Fig. 12). The benzene ring of F192 forms stacking interactions with the aromatic ring from the polar head of **PF543**. While these interactions together only contribute to the anchoring of **PF543** with the strength of a weak hydrogen bond ($\sum \rho b = 0.0064$ a.u.) they seem to be critical for the proper positioning of the inhibitor into the enzyme cavity.

Fig. 13b displays the most relevant interactions observed for compound **2**. It should be noted that this compound has less and weaker interactions than those of **PF543**. Unlike **PF543**, compound

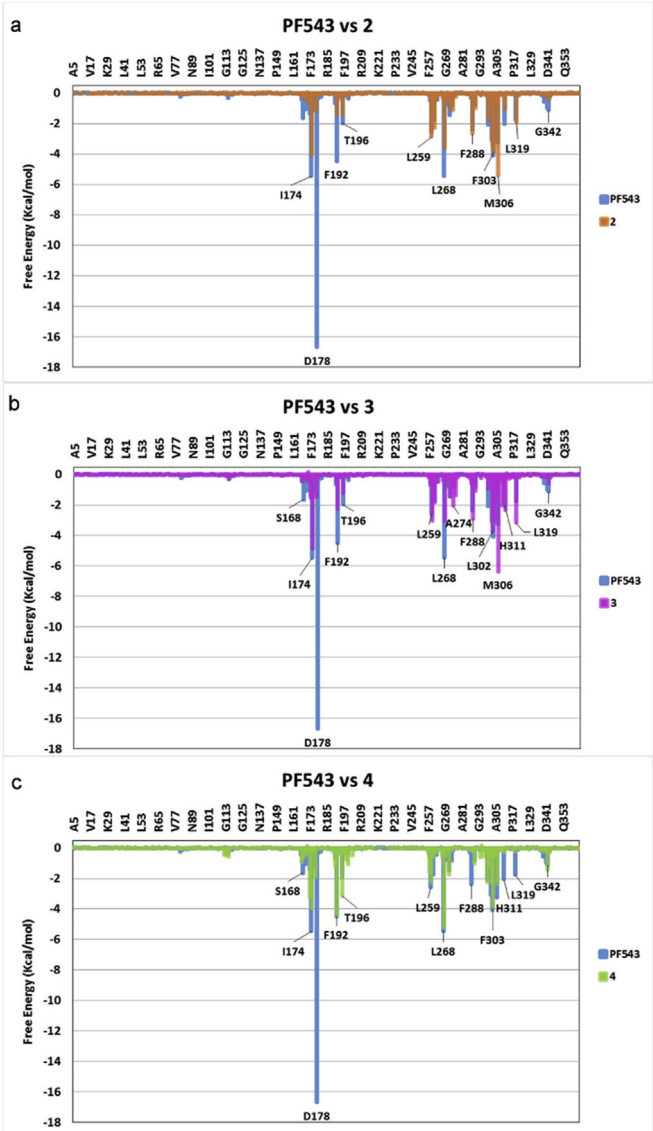


Fig. 10. Overimposed Histograms showing the interaction energies of compounds **2** (orange), **3** (violet) and **4** (green) with the main amino acids involved in the complex formation. The histogram obtained for PF543 is shown in light blue for comparison. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2 does not form any interaction with D178. Moreover, Compound **2** virtually does not form interactions with residues from helix α7 and from sheet β14 that conform the front and back walls of the entrance to the SphK1 cavity, respectively. This is because polar part of compound **2** is not big enough and so the anchoring is driven by its hydrophobic tail that tends to occupy the back of the J-shaped cavity. This is highlighted in the complex structure at the right of the decomposition profile for this compound shown in Fig. 12. The polar head of compound **2** is anchored at the enzyme cavity mainly due to interactions with residues from helix α8 (F192, T193, T196) and α9 (L268, M302, F306), which are halfway between the entrance and the bottom of the J-shaped cavity.

In summary, our molecular modelling study clearly indicates that **PF543** provides stronger molecular interactions with SphK1 than the new compounds reported here. These results are in a complete agreement with the experimental data and could at least partly explain the significantly lower inhibitory effects observed for these compounds.

3. Conclusion

This theoretical and experimental study has allowed us to find two new structural scaffolds (three new compounds), which could be used as starting structures for the design and then the development of new inhibitors of SphK1. It was carried out in several steps: virtual screening, synthesis, bioassays and molecular modelling and has allowed us to propose compound **2** as an excellent starting structure for the development of new SphK1 inhibitors. The dihydrobenzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine motif represents a novel core for SphK1 inhibitors and should find application to the design and development of new inhibitors of this enzyme. In future publications from our group, we will detail the evolution of this pharmacophore to new core structures with greater intrinsic potency.

On the other hand, although compounds **4** and **3** showed less activity as inhibitors, considering that they have been obtained from a primary screening, these compounds are promising and also deserve to be further analyzed as alternatives initial structures. Another interesting contribution of this work is the insight in to details of certain structural aspects which are essential for understanding the formation of the complex ligand-SphK1 interactions.

On the basis of our molecular modelling results, it seems that from the results already obtained in the first steps, it is possible to obtain useful information and guidance for the design of new inhibitors. It seems that those structures, in which it is possible to distinguish more clearly the portion corresponding to the cationic head and the hydrophobic tail, are more likely to be good ligands for the active site of the SphK1. It is important to remark that such information cannot be obtained using very simple methods like the docking techniques for example. To obtain more detailed information on these molecular complexes, it is necessary to use more specific techniques. Thus, using QTAIM calculations enabled us to describe the molecular interactions that stabilize the different L-R complexes and to draw conclusions regarding two aspects; on the one hand, to explain why these novel compounds are significantly less potent SphK1 inhibitors than **PF543**, and on the other hand to determine what portion of the compounds should be changed in order to increase their affinity with the SphK1. From our results, it is clear that the cationic head group must be enhanced in order to obtain an increased in the binding of these ligands.

4. Experimental section

4.1. General

Commercially available compounds were used as received, unless stated otherwise. Melting points were measured by a Barstead electrothermal 9100 apparatus or a Kofler hot plate apparatus HMK (Franz Kustner Nacht GK, Dresden, Germany) are uncorrected. TLC was performed on silica gel 60 F_{254} on aluminium plates (Merck, Darmstadt, Germany) and visualized with UV light (254 nm). Residues were purified by silica gel 60 (40–63 μm, Merck 9385) column chromatography. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra were standardly recorded at 25 °C with $CDCl_3$, methanol-d_4 or DMSO-d_6 as solvents on Bruker AC-300, AC-400, AC-500 or Avance III 400 MHz FT-NMR spectrometers (Bruker, Karlsruhe, Germany). The carbon typology (C, CH, CH_2 or CH_3) was deduced from ^{13}C NMR DEPT experiments, which along with the 2D experiments, COSY, HSQC and HMBC correlations, permitted the fully assignation of all carbons and hydrogens. Chemical shifts are relative to the solvent peaks used as reference and reported in δ parts per million (ppm), and J values in Hz. High-resolution mass spectra (HRMS) were

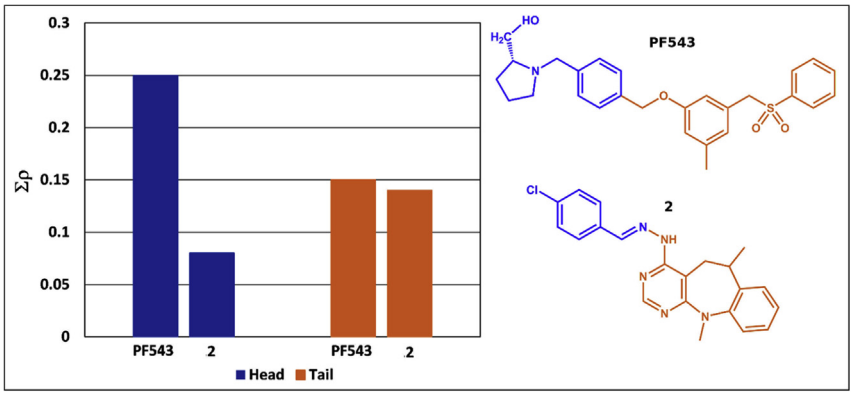


Fig. 11. Charge density values for the total interactions of the polar head (blue stacked bars) and the hydrophobic portion (orange stacked bars) for **PF543** and compound **2** at the binding pocket. The repulsive short C–H···H–C contacts were not included. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

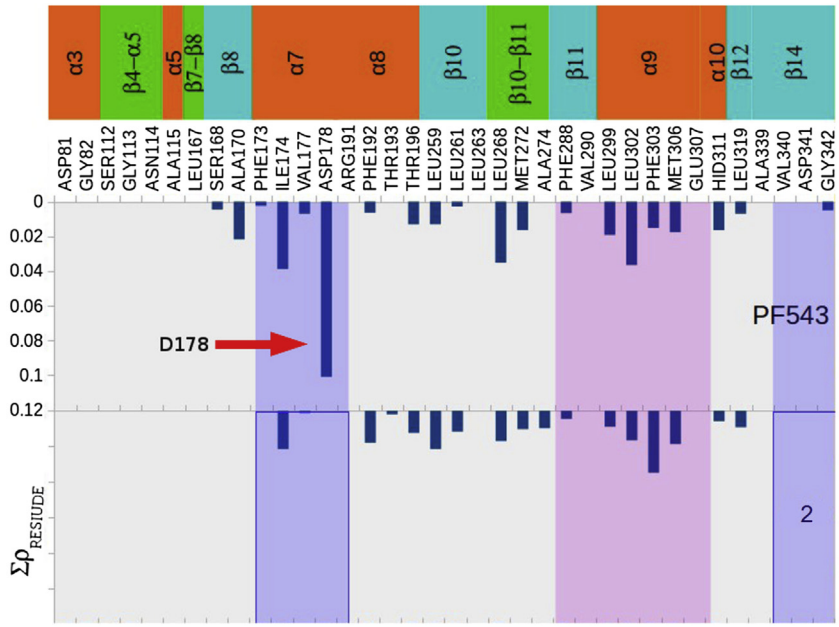


Fig. 12. Charge density values obtained for the total interactions of **PF543** and compound **2**, showing the different interacting amino acids. The strong interaction of **PF543** with Asp178 is denoted with a red arrow. This interaction is missing in compound **2**. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

measured using a high-performance liquid chromatograph Dionex UltiMate® 3000 (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA) coupled with a LTQ Orbitrap XL™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometer (Thermo Scientific) with injection into HESI II in the positive or negative mode, or on a Waters Micromass AutoSpect NT (equipped with a direct inlet probe) by electronic impact operating at 70 eV.

4.2. Chemistry

4.2.1. Synthesis of compound 2

(*E*)-4-(2-(4-chlorobenzylidene)hydrazinyl)-6,11-dimethyl-6,11-dihydro-5*H*-benzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine (**2**). Hydrazine monohydrate (0.15 mL, 3.0 mmol) was added to a stirred solution of 4-chloro-6,11-dihydro-5*H*-benzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine (100 mg, 0.39 mmol) [52] in ethanol (10 mL). The mixture was heated at reflux for 24 h, and then ethanol and excess of hydrazine were removed under reduced pressure. The solid residue was washed with water (2 × 50 mL), and then dried and used without further purification in the next step. To a solution of above intermediate 6,11-dimethyl-4-hydrazinyl-6,11-dihydro-5*H*-benzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine (99.6 mg, 0.39 mmol) in ethanol (3 mL), *p*-chlorobenzaldehyde (68.3 mg, 0.49 mmol) and two drops of glacial acetic acid were added. The mixture was heated at reflux for 4 h. The reaction mixture was cooled to ambient temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc 50:50) to afford the hydrazine **1** as a white solid in yield 66%; m.p. > 150 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.38 (s, 1H, CH-2), 8.00 (br s, 1H, NH-4), 7.79 (br s, 1H, -N=CH), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH-2′ and CH-6′), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH-3′ and CH-5′), 7.22–7.27 (m, 2H, CH-7 and CH-9), 7.13–7.19 (m, 2H, CH-8 and CH-10), 3.67–3.75 (m, 1H, CH-6), 3.52 (s, 3H, CH_3-11), 2.90 (dd, J = 15.6, 2.2 Hz, 1H, CH_A-5), 2.68 (dd, J = 15.6, 11.2 Hz, 1H, CH_B-5), 1.47 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3-6). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 160.2, 157.9, 154.5, 146.4, 141.4, 140.4, 135.2, 132.6, 128.9, 128.2, 126.9, 124.9, 123.9, 122.2, 98.6, 39.9, 38.7, 32.4,

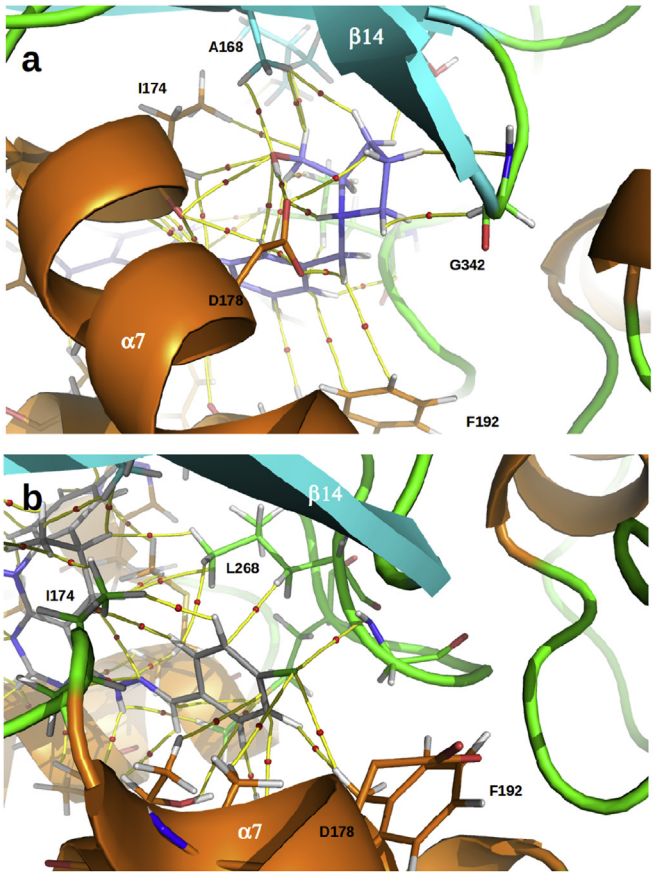


Fig. 13. a) Molecular graph of charge density obtained for the complex of SphK1 with **PF543** (in violet). Yellow lines connecting the nuclei are the bond paths, and the small red spheres on them are the bond critical points (BCPs). b) Molecular graph obtained for the complex of SphK1 with compound **2** (in gray). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

18.8. HRMS (EI, 70 eV): $C_{21}H_{18}ClN_5$ $[M - 2H]^+$ calculated 375.1251 *m/z*, found 375.1242 *m/z*.

*4.2.2. Synthesis of compounds **3**–**6***

*4.2.2.1. General procedure for the preparation of alkyl (3-/4-acetylphenyl)carbamates (**3a**–**6a**).* A solution of an appropriate alkyl chloroformiate (37 mmol) in acetone (5 mL) was added dropwise to a stirred solution of 3-aminoacetophenone (5.00 g; 37 mmol) or 4-aminoacetophenone (5.00 g; 37 mmol) and pyridine (3.0 mL; 37 mmol) in acetone (20 mL), and then the mixture was heated to reflux for 3 h. The solvent was removed at reduced pressure, and the resulting solid was washed with water, and recrystallized from EtOH.

*4.2.2.1.1. Butyl (3-acetylphenyl)carbamate (**3a**).* White solid, Yield 91%, m.p. 58–59 °C [53–55 °C [74]. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.92 (t, 3H, -CH_3, J = 6.2 Hz), 1.33–1.46 (m, 2H, -CH_2-), 1.54–1.64 (m, 2H, -CH_2-), 2.54 (s, 3H, -CH_3), 4.09 (t, 2H, -CH_2-, J = 6.6 Hz), 7.42 (t, 1H, ArH, J = 7.9 Hz), 7.60 (d, 1H, ArH, J = 7.7 Hz), 7.68 (d, 1H, ArH, J = 7.7 Hz), 8.07 (s, 1H, ArH), 9.83 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 197.5, 153.6, 139.6, 137.4, 129.0, 122.6, 122.3, 117.3, 63.9, 30.5, 26.6, 18.5, 13.5.

*4.2.2.1.2. Butyl (4-acetylphenyl)carbamate (**4a**).* White solid, Yield 95%, m.p. 89–91 °C [87–88.5 °C [74]. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.92 (t, 3H, -CH_3, J = 7.3 Hz), 1.30–1.48 (m, 2H, -CH_2-), 1.55–1.69 (m, 2H, -CH_2-), 2.51 (s, 3H, -CH_3), 4.11 (t, 2H, -CH_2-, J = 6.6 Hz), 7.60 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 7.91 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 10.05 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 196.3, 153.4, 143.7, 130.9, 129.4, 117.2, 64.1, 30.4, 26.2, 18.47, 13.5.

*4.2.2.1.3. Methyl (3-acetylphenyl)carbamate (**5a**=**6a**).* White solid, Yield 95%, m.p. 103–104 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 2.55 (s, 3H, -CH_3), 3.69 (s, 3H, -OCH_3), 7.44 (t, 1H, ArH, J = 8.2 Hz), 7.61 (d, 1H, ArH, J = 7.3 Hz), 7.71 (d, 1H, ArH, J = 7.7 Hz), 8.06 (s, 1H, ArH), 9.87 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 197.5, 153.9, 139.5, 137.4, 129.0, 122.6, 122.4, 117.3, 51.5, 26.5.

*4.2.2.2. General procedure for the preparation of alkyl [3-/4-(bromoacetyl)phenyl]carbamates (**3b**–**6b**).* Into a stirred solution of an appropriate alkyl (3-/4-acetylphenyl)carbamate (36 mmol) in chloroform (80 mL), a solution of bromine (1.9 mL; 36 mmol) in chloroform (10 mL) was added dropwise and stirred for 3 h at ambient temperature. The solvent was removed under reduced pressure. Solid crude products were recrystallized from *i*-PrOH.

*4.2.2.2.1. Butyl [3-(bromoacetyl)phenyl]carbamate (**3b**).* White solid, Yield 85%, m.p. 80–86 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.92 (t, 3H, -CH_3, J = 7.3 Hz), 1.34–1.47 (m, 2H, -CH_2-), 1.54–1.64 (m, 2H, -CH_2-), 4.10 (t, 2H, -CH_2-, J = 6.6 Hz), 4.88 (s, 2H, -CH_2-), 7.46 (t, 1H, ArH, J = 7.9 Hz), 7.65–7.77 (m, 2H, ArH), 8.10 (s, 1H, ArH), 9.89 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 191.4, 153.6, 139.8, 134.5, 129.2, 123.3, 122.9, 117.6, 63.9, 33.6, 30.4, 18.5, 13.4.

*4.2.2.2.2. Butyl [4-(bromoacetyl)phenyl]carbamate (**4b**).* White solid, Yield 85%, m.p. 152–154 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.92 (t, 3H, -CH_3, J = 7.3 Hz), 1.30–1.48 (m, 2H, -CH_2-), 1.56–1.70 (m, 2H, -CH_2-), 4.12 (t, 2H, -CH_2-, J = 6.6 Hz), 4.84 (s, 2H, -CH_2-), 7.62 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 7.96 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 10.13 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 190.1, 153.3, 144.4, 130.1, 127.8, 117.3, 64.2, 33.4, 30.4, 18.5, 13.5.

*4.2.2.2.3. Methyl [3-(bromoacetyl)phenyl]carbamate (**5b**=**6b**).* White solid, Yield 75%, m.p. 99–103 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 3.68 (s, 3H, -CH_3), 4.89 (s, 2H, -CH_2-), 7.47 (t, 1H, ArH, J = 8.1 Hz), 7.66–7.78 (m, 2H, ArH), 8.08 (s, 1H, ArH), 9.92 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 191.4, 153.9, 139.7, 134.5, 129.2, 123.3, 122.9, 117.6, 51.6, 33.6.

*4.2.2.3. General procedure for preparation of alkyl {3-/4-[(4-arylpiperazin-1-yl)acetyl]phenyl} carbamates (**3c**–**6c**).* A solution of arylpiperazine (5.5 mmol) and triethylamine (0.8 mL; 5.5 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added dropwise to a stirred solution of an appropriate alkyl [3-/4-(bromoacetyl)phenyl]carbamate (5.5 mmol) in anhydrous THF (30 mL), and the mixture stirred for 3 h at ambient temperature. The solvents were removed under reduced pressure, and added chloroform (100 mL) and water. The organic phase was washed with additional water, dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent removed under reduced pressure, to give a solid crude product, which was recrystallized from acetone.

*4.2.2.3.1. Butyl {3-[(4-(pyridine-4-yl)piperazin-1-yl)acetyl]phenyl}carbamate (**3c**).* White solid, Yield 37%, m.p. 154–158 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.92 (t, 3H, -CH_3, J = 7.0 Hz), 1.29–1.47 (m, 2H, -CH_2-), 1.54–1.67 (m, 2H, -CH_2-), 2.50–2.75 (m, 4H, -CH_2-), 3.20–3.40 (m, 4H, -CH_2-), 3.88 (s, 2H, -CH_2-), 4.09 (t, 2H, -CH_2-, J = 6.6 Hz), 6.79–6.87 (m, 2H, ArH), 7.42 (t, 1H, ArH, J = 7.9 Hz), 7.63–7.82 (m, 2H, ArH), 8.13–8.16 (m, 2H, ArH), 8.32 (s, 1H, ArH), 9.85 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 196.4, 154.5, 153.6, 149.6, 139.6, 136.4, 128.9, 122.7, 122.1, 117.3, 108.3, 63.9, 63.4, 52.0, 45.4, 30.5, 18.5, 13.5.

*4.2.2.3.2. Butyl {4-[(4-(pyridine-4-yl)piperazin-1-yl)acetyl]phenyl}carbamate (**4c**).* White solid, Yield 19%, m.p. 113–114 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.91 (t, 3H, -CH_3, J = 7.3 Hz), 1.30–1.50 (m, 2H, -CH_2-), 1.52–1.70 (m, 2H, -CH_2-), 2.55–2.70 (m, 4H, -CH_2-), 3.22–3.35 (m, 4H, -CH_2-), 3.83 (s, 2H, -CH_2-), 4.10 (t, 2H, -CH_2-, J = 6.6 Hz), 6.80 (d, 2H, ArH, J = 6.6 Hz), 7.58 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz),

7.95 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 8.14 (d, 2H, ArH, $J = 6.2$ Hz), 10.05 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 195.2, 154.5, 153.3, 149.6, 143.8, 129.9, 129.4, 117.1, 108.3, 63.4, 63.2, 52.0, 45.4, 30.5, 18.5, 13.5.

*4.2.2.3.3. Methyl {3-[(4-(pyridine-2-yl)piperazin-1-yl)acetyl] phenyl}carbamate (**5c**).* White solid, Yield 89%, m.p. 130–133 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 2.58–2.62 (m, 4H, -CH_2-), 3.47–3.51 (m, 4H, -CH_2-), 3.68 (s, 3H, -CH_3), 3.86 (s, 2H, -CH_2-), 6.62 (dd, 1H, ArH, $J = 6.9$, $J = 5.0$ Hz), 6.81 (d, 1H, ArH, $J = 8.1$ Hz), 7.43 (t, 1H, ArH, $J = 7.8$ Hz), 7.51 (ddd, 1H, ArH, $J = 8.7$, $J = 7.1$, $J = 2.1$ Hz), 7.66 (d, 1H, ArH, $J = 7.8$ Hz), 7.71 (dd, 1H, ArH, $J = 6.9$, $J = 5.0$ Hz), 8.09–8.11 (m, 2H, ArH), 9.87 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 159.1, 154.0, 147.6, 145.4, 138.9, 137.5, 128.3, 120.2, 116.8, 115.9, 112.9, 107.1, 69.9, 66.4, 52.9, 51.6, 44.7.

*4.2.2.3.4. Methyl {3-[(4-(pyrimidine-2-yl)piperazin-1-yl)acetyl] phenyl}carbamate (**6c**).* White solid, Yield 97%, m.p. 94–96 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 2.50–2.68 (m, 4H, -CH_2-), 3.68 (s, 3H, -CH_3), 3.72–3.77 (m, 4H, -CH_2-), 3.87 (s, 2H, -CH_2-), 6.61 (t, 1H, ArH, $J = 4.8$ Hz), 7.43 (t, 1H, ArH, $J = 8.1$ Hz), 7.60–7.80 (m, 2H, ArH), 8.10 (s, 1H, ArH), 8.34 (d, 2H, ArH, $J = 4.8$ Hz), 9.84 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 196.4, 161.1, 157.8, 153.9, 139.5, 136.4, 128.9, 122.7, 122.2, 117.3, 109.9, 63.6, 52.3, 51.6, 43.1.

*4.2.2.4. General procedure for preparation of alkyl {3-/4-[1-hydroxy-2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethyl] phenyl}carbamates (**3**–**6**).* Solid sodium borohydride (0.30 g; 8.0 mmol) was added in small portions to a solution of the appropriate alkyl {3-/4-[(4-arylpiperazin-1-yl) acetyl]phenyl} carbamate (4.0 mmol) in hot methanol (50 mL), and then the mixture was refluxed for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was treated with distilled water (100 mL) and chloroform (100 mL). The organic phase was washed with additional water, dried over anhydrous sodium sulfate and solvent removed under reduced pressure to give a crude product, which was recrystallized from acetone.

*4.2.2.4.1. Butyl {3-[1-hydroxy-2-(4-(pyridine-4-yl)piperazin-1-yl) ethyl]phenyl}carbamate (**3**).* White solid, Yield 96%, m.p. 147–149 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.90 (t, 3H, -CH_3, $J = 7.1$ Hz), 1.26–1.45 (m, 2H, -CH_2-), 1.52–1.66 (m, 2H, -CH_2-), 2.36–2.48 (m, 2H, -CH_2N), 2.48–2.59 (m, 4H, -CH_2-), 3.20–3.35 (m, 4H, -CH_2-), 4.05 (t, 2H, -CH_2-, $J = 6.6$ Hz), 4.64–4.72 (m, 1H, -CH-), 5.09 (d, 1H, OH, $J = 3.7$ Hz), 6.77–6.85 (m, 2H, ArH), 6.96 (d, 1H, ArH, $J = 7.7$ Hz), 7.19 (t, 1H, ArH, $J = 7.7$ Hz), 7.31 (d, 1H, ArH, $J = 7.7$ Hz), 7.50 (s, 1H, ArH), 8.12–8.15 (m, 2H, ArH), 9.56 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 154.5, 153.6, 149.7, 145.2, 138.1, 128.1, 120.0, 116.8, 116.0, 108.2, 69.9, 66.1, 63.7, 52.6, 45.2, 30.6, 18.5, 13.5. HR-MS (Orbitrap): $C_{22}H_{31}N_4O_3$ [M+H]$^+$ calculated 399.2391 *m/z*, found 399.2385 *m/z*.

*4.2.2.4.2. Butyl {4-[1-hydroxy-2-(4-(pyridine-4-yl)piperazin-1-yl)ethyl]phenyl}carbamate (**4**).* White solid, Yield 53%, m.p. 175–179 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.90 (t, 3H, -CH_3, $J = 7.3$ Hz), 1.28–1.46 (m, 2H, -CH_2-), 1.53–1.66 (m, 2H, -CH_2-), 2.35–2.55 (m, 2H, -CH_2N), 2.55–2.65 (m, 4H, -CH_2-), 3.15–3.35 (m, 4H, -CH_2-), 4.05 (t, 2H, -CH_2-, $J = 6.6$ Hz), 4.64–4.73 (m, 1H, -CH-), 5.00 (d, 1H, OH, $J = 3.7$ Hz), 6.79 (d, 2H, ArH, $J = 6.3$ Hz), 7.24 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 7.39 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 8.13 (d, 2H, ArH, $J = 6.3$ Hz), 9.55 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 154.5, 153.6, 149.7, 138.4, 137.8, 126.3, 117.9, 108.2, 69.9, 66.1, 63.7, 52.6, 45.4, 30.5, 18.5, 13.5. HR-MS (Orbitrap): $C_{22}H_{31}N_4O_3$ [M+H]$^+$ calculated 399.2391 *m/z*, found 399.2399 *m/z*.

*4.2.2.4.3. Methyl {3-[1-hydroxy-2-(4-(pyridine-2-yl)piperazin-1-yl)ethyl]phenyl}carbamate (**5**).* White solid, Yield 69%, m.p. 174–177 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 2.38–2.55 (m, 2H, -CH_2N), 2.55–2.58 (m, 4H, -CH_2-), 3.44–3.48 (m, 4H, -CH_2-), 3.65 (s, 3H, -CH_3), 4.68–4.72 (m, 1H, -CH-), 5.07 (d, 1H, OH, $J = 3.2$ Hz), 6.62 (dd, 1H, ArH, $J = 7.1$, $J = 5.3$ Hz), 6.80 (d, 1H, ArH, $J = 8.7$ Hz), 6.98 (d, 1H, ArH, $J = 7.8$ Hz), 7.21 (t, 1H, ArH, $J = 7.8$ Hz), 7.34 (d, 1H, ArH, $J = 8.2$ Hz), 7.48 (s, 1H, ArH), 7.51 (ddd, 1H, ArH, $J = 8.7$, $J = 7.1$, $J = 2.1$ Hz), 8.09–8.11 (m, 1H, ArH), 9.60 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 159.1, 154.0, 147.6, 145.4, 138.9, 137.5, 128.3, 120.2, 116.8, 115.9, 112.9, 107.1, 69.9, 66.4, 52.9, 51.6, 44.7. HR-MS (Orbitrap): $C_{19}H_{25}N_4O_3$ [M+H]$^+$ calculated 357.1921 *m/z*, found 357.1939 *m/z*.

*4.2.2.4.4. Methyl {3-[1-hydroxy-2-(4-(pyrimidine-2-yl)piperazin-1-yl)ethyl]phenyl}carbamate (**6**).* White solid, Yield 55%, m.p. 157–159 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 2.36–2.48 (m, 2H, -CH_2N), 2.50–2.60 (m, 4H, -CH_2-), 3.64 (s, 3H, -CH_3), 3.70–3.80 (m, 4H, -CH_2-), 4.64–4.72 (m, 1H, -CH-), 5.07 (d, 1H, OH, $J = 3.7$ Hz), 6.60 (t, 1H, ArH, $J = 4.8$ Hz), 6.97 (d, 1H, ArH, $J = 7.3$ Hz), 7.20 (t, 1H, ArH, $J = 7.7$ Hz), 7.33 (d, 1H, ArH, $J = 7.9$ Hz), 7.50 (s, 1H, ArH), 8.30–8.40 (m, 2H, ArH), 9.59 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 161.2, 157.8, 153.9, 145.3, 138.8, 128.2, 120.1, 116.8, 116.0, 109.9, 69.8, 66.3, 52.9, 51.4, 43.3. HR-MS (Orbitrap): $C_{18}H_{24}N_5O_3$ [M+H]$^+$ calculated 358.1874 *m/z*, found 358.1894 *m/z*.

*4.2.3. Synthesis of compounds **7**–**9***

*4.2.3.1. General procedure for preparation of 1-(3-{4-[(alkoxycarbonyl)amino]benzoyloxy}-2-hydroxypropyl)-4-phenylpiperazin-1-ium chlorides (**7**–**9**).* A mixture of epoxides **7a**–**9a** [53] (0.2 mol) and 1-(4-phenyl)piperazine (0.2 mol) in *i*-PrOH (150 mL) was heated at 80 °C for 4 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the residing oil was dissolved in Et_2O. The solution of the base was converted to its chloride salt by addition of ethereal HCl. The amine salt was collected by filtration and recrystallized from *i*-PrOH to give white crystals.

*4.2.3.1.1. 1-(2-Hydroxy-3-{4-[(methoxycarbonyl)amino]benzoyloxy}propyl)-4-phenylpiperazin-1-ium chloride (**7**).* Yield 62%, R_f: 0.83 (acetone/toluene 3:1), m.p. 197–200 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 10.74 (s, 1H, -NH$^+$-), 10.17 (s, 1H, -NH), 7.98 (d, $^3J = 8.7$, 2H, ArH^{2,6}), 7.63 (d, $^3J = 8.7$, 2H, ArH^{3,5}), 7.30–7.22 (m, 2H, ArH-N$_{pip}$), 7.02–6.98 (m, 2H, ArH-N$_{pip}$), 6.89–6.82 (m, 1H, ArH-N$_{pip}$), 6.07 (s, 1H, -OH), 4.49–4.46 (m, 1H, -CH(OH)), 4.24–4.21 (m, 2H, -$COOCH_2$-), 3.83–3.56 (m, 4H, H$_{pip}$), 3,69 (s, 3H, -CH_3), 3.38–3.11 (m, 6H, H$_{pip}$ + -CH_2N$_{pip}$). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 165.1, 153.7, 149.5, 143.9, 130.6, 129.0, 122.9, 119.8, 117.3, 115.8, 66.0, 63.3, 58.2, 52.1, 51.8, 50.7, 45.2. HR-MS (Orbitrap): $C_{23}H_{26}N_3O_5$ [M − H]$^-$ calculated 412.1877 *m/z*, found 412.1885 *m/z*.

*4.2.3.1.2. 1-(3-{4-[(ethoxycarbonyl)amino]benzoyloxy}-2-hydroxypropyl)-4-phenylpiperazin-1-ium chloride (**8**).* Yield 68%, R_f: 0.86 (acetone/toluene 3:1), m.p. 192–194 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 10.75 (s, 1H, -NH$^+$-), 10.12 (s, 1H, -NH), 7.98 (d, $^3J = 8.6$, 2H, ArH^{2,6}), 7.63 (d, $^3J = 8.6$, 2H, ArH^{3,5}), 7.30–7.22 (m, 2H, ArH-N$_{pip}$), 7.02–6.98 (m, 2H, ArH-N$_{pip}$), 6.89–6.82 (m, 1H, ArH-N$_{pip}$), 6.07 (s, 1H, -OH), 4.49–4.46 (m, 1H, -CH(OH)-), 4.23–4.10 (m, 4H, -$COOCH_2$- + -CH_2CH_3), 3.83–3.61 (m, 4H, H$_{pip}$), 3.38–3.11 (m, 6H, H$_{pip}$ + -CH_2N$_{pip}$), 1,25 (t, $^3J = 7.1$, 3H, -CH_3). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 165.1, 153.3, 149.5, 144.0, 130.6, 129.0, 122.8, 119.8, 117.3, 115.8, 66.0, 63.3, 60.5, 58.2, 52.1, 50.8, 45.2, 14.4. HR-MS (Orbitrap): $C_{24}H_{28}N_3O_5$ [M − H]$^-$ calculated 426.2034 *m/z*, found 426.2042 *m/z*.

*4.2.3.1.3. 1-(3-{4-[(butoxycarbonyl)amino]benzoyloxy}-2-hydroxypropyl)-4-phenylpiperazin-1-ium chloride (**9**).* Yield 57%, R_f: 0.92 (acetone/toluene 3:1), m.p. 178–182 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 10.71 (s, 1H, -NH$^+$-), 10.11 (s, 1H, -NH), 7.98 (d, $^3J = 8.6$, 2H, ArH^{2,6}), 7.63 (d, $^3J = 8.6$, 2H, ArH^{3,5}), 7.30–7.22 (m, 2H, ArH-N$_{pip}$), 7.02–6.98 (m, 2H, ArH-N$_{pip}$), 6.89–6.82 (m, 1H, ArH-N$_{pip}$), 6.07 (s, 1H, -OH), 4.51–4.43 (m, 1H, -CH(OH)-), 4.23–4.21 (m, 2H, -$COOCH_2$-), 4,11 (t, $J = 6.5$, 2H, -$CH_2(CH_2)_2CH_3$), 3.83–3.61 (m, 4H, H$_{pip}$), 3.41–3.10 (m, 6H, H$_{pip}$ + -CH_2N$_{pip}$), 1.68–1.54 (m, 2H, -$CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.47–1.29 (m, 2H, -$(CH_2)_2CH_2CH_3$), 0.91 (t, $J = 7.2$, 3H, -$(CH_2)_3CH_3$). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 165.1, 153.4, 149.5, 144.0, 130.6, 129.0, 122.8, 119.8, 117.3, 115.8, 66.0, 63.3, 61.9, 58.2, 52.1, 50.8, 45.2, 30.4, 18.5, 13.5. HR-MS (Orbitrap): $C_{26}H_{32}N_3O_5$ [M − H]$^-$ calculated 454.2347 *m/z*, found 454.2355 *m/z*.

*4.2.4. Synthesis of compounds **10**–**12***

*4.2.4.1. General procedure for the syntheses of **10**–**12**.* A solution of the corresponding (1-alkylpiperidin-4-yl)methanamine **10b**–**12b** [56,57] (11.60 mmol) in methanol (30 mL) was added dropwise to a solution of the appropriate alkyl [4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl] carbamate **10a**–**12a** [58] (9.00 mmol) in methanol (40 mL). The resulting mixture was left stirring for two days at ambient temperature and then concentrated under reduced pressure. The respective free bases obtained as yellowish oils were dissolved in acetone (10 mL) and treated with a solution of methanesulfonic acid (2 equiv.) in acetone (5 mL) by dropwise addition at 0 °C. The resulting mixtures were stirred at ambient temperature overnight and then concentrated in vacuo to furnish dimesylates **10**–**12** as solids that were recrystallized as described below.

*4.2.4.1.1. 4-{[(2-hydroxy-3-{4-[(methoxycarbonyl)amino]phenoxy}propyl)azaniumyl]methyl}-1-butylpiperidin-1-ium dimethanesulfonate (**10**).* The compound was prepared from methyl [4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl]carbamate (**10a**=**12a**) and (1-butylpiperidin-4-yl)methanamine (**10b**=**11b**). Crystallization from *i*-PrOH afforded **10** as white crystalline powder (1.10 g, overall yield (2 steps): 33%), m.p. 94–97 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.91 (t, $^1J_{HH}$ = 7.3 Hz, 3H, CH_3 (*$\underline{CH_3}CH_2CH_2CH_2$*)), 1.20–1.75 (m, 6H, CH_2 (*$CH_3\underline{CH_2}\underline{CH_2}CH_2$ + piperidine*)), 1.88–2.09 (m, 3H, CH + CH_2 (*piperidine*)), 2.37 (s, 6H, CH_3 (2 × *$\underline{CH_3}SO_2$*)), 2.74–3.25 (m, 8H, CH_2 (*piperidine + $\underline{CH_2}NH_2CH_2$ + $CH_3CH_2CH_2\underline{CH_2}NH$*)), 3.42–3.59 (m, 2H, CH_2 (*$NH_2\underline{CH_2}CH(OH)$*)), 3.63 (s, 3H, CH_3 (*$\underline{CH_3}OCONH$*)), 3.79–4.04 (m, 2H, CH_2 (*$CH_2CH(OH)\underline{CH_2}$*)), 4.10–4.26 (m, 1H, CH (*$CH_2\underline{CH}(OH)CH_2$*)), 5.81 (d, $^1J_{HH}$ = 3.5 Hz, 1H, OH), 6.89 (d, $^1J_{HH}$ = 9.0 Hz, 2H, $CH_{arom.}$), 7.36 (d, $^1J_{HH}$ = 9.0 Hz, 2H, $CH_{arom.}$), 8.51 (br. s., 2H, NH_2 (*$CH_2\underline{NH_2}CH_2$*)), 9.09 (br. s., 1H, NH (*piperidine*)), 9.43 (s, 1H, NH (*$CH_3OCO\underline{NH}$*)). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 13.4, 19.4, 25.2, 26.6, 30.4, 39.7, 49.9, 51.1, 51.40, 51.44, 55.7, 64.7, 70.0, 114.7, 119.8, 132.6, 153.7, 154.1. HR-MS (Orbitrap): $C_{21}H_{35}N_3O_4$ $[M+H]^+$ calculated 394.2706 *m/z*, found 394.2701 *m/z*.

*4.2.4.1.2. 4-{[(2-hydroxy-3-{4-[(butoxycarbonyl)amino]phenoxy}propyl)azaniumyl]methyl}-1-butylpiperidin-1-ium dimethanesulfonate (**11**).* The compound was prepared from butyl [4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl]carbamate (**11a**) and (1-butylpiperidin-4-yl) methanamine (**10b**=**11b**). Crystallization from *i*-PrOH/*i*-Pr_2O afforded **11** as white crystalline powder (0.67 g, overall yield (2 steps): 26%), m.p. 108–110 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.91 (t, $^1J_{HH}$ = 7.3 Hz, 6H, CH_3 (2 × *$\underline{CH_3}CH_2CH_2CH_2$*)), 1.14–1.73 (m, 10H, CH_2 (2 × *$CH_3\underline{CH_2}\underline{CH_2}CH_2$ + piperidine*)), 1.85–2.08 (m, 3H, CH + CH_2 (*piperidine*)), 2.37 (s, 6H, CH_3 (2 × *$\underline{CH_3}SO_2$*)), 2.76–3.26 (m, 8H, CH_2 (*piperidine + $\underline{CH_2}NH_2CH_2$ + $CH_3CH_2CH_2\underline{CH_2}NH$*)), 3.43–3.60 (m, 2H, CH_2 (*$NH_2\underline{CH_2}CH(OH)$*)), 3.84–3.99 (m, 2H, CH_2 (*$CH_2CH(OH)\underline{CH_2}$*)), 4.05 (t, J_{HH} = 6.6 Hz, 2H, CH_2 (*$CH_3CH_2CH_2\underline{CH_2}O$*)), 4.09–4.26 (m, 1H, CH (*$CH_2\underline{CH}(OH)CH_2$*)), 5.81 (d, $^1J_{HH}$ = 4.1 Hz, 2H, OH), 6.88 (d, $^1J_{HH}$ = 9.0 Hz, 2H, $CH_{arom.}$), 7.37 (d, $^1J_{HH}$ = 9.0 Hz, 2H, $CH_{arom.}$), 8.51 (br. s., 2H, NH_2 (*$CH_2\underline{NH_2}CH_2$*)), 9.09 (br. s., 1H, NH (*piperidine*)), 9.39 (s, 1H, NH (*$CH_3OCO\underline{NH}$*)). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 13.4, 13.5, 18.6, 19.4, 25.2, 26.6, 30.4, 30.6, 39.7, 49.9, 51.1, 51.4, 55.7, 63.7, 64.7, 70.0, 114.7, 119.7, 132.7, 153.6, 153.7. HR-MS (Orbitrap): $C_{24}H_{41}N_3O_4$ $[M+H]^+$ calculated 436.3175 *m/z*, found 436.3170 *m/z*.

*4.2.4.1.3. 4-{[(2-hydroxy-3-{4-[(methoxycarbonyl)amino]phenoxy}propyl)azaniumyl]methyl}-1-propylpiperidin-1-ium dimethanesulfonate (**12**).* The compound was prepared from methyl [4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl]carbamate (**10a**=**12a**) and (1-propylpiperidin-4-yl)methanamine (**12b**). Crystallization from MeOH/*i*-PrOH afforded **12** as white crystalline powder (0.83 g, overall yield (2 steps): 42%), m.p. 158–160 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.90 (t, $^1J_{HH}$ = 7.3 Hz, 3H, CH_3 (*$\underline{CH_3}CH_2CH_2$*)), 1.34–1.77 (m, 4H, CH_2 (*$CH_3\underline{CH_2}CH_2$ + piperidine*)), 1.85–2.12 (m, 3H, CH + CH_2 (*piperidine*)), 2.39 (s, 6H, CH_3 (2 × *$\underline{CH_3}SO_2$*)), 2.65–3.23 (m, 8H, CH_2 (*piperidine + $\underline{CH_2}NH_2CH_2$ + $CH_3CH_2\underline{CH_2}NH$*)), 3.35–3.55 (m, 2H, CH_2 (*$NH_2\underline{CH_2}CH(OH)$*)), 3.63 (s, 3H, CH_3 (*$\underline{CH_3}OCONH$*)), 3.88–4.00 (m, 2H, CH_2 (*$CH_2CH(OH)\underline{CH_2}$*)), 4.17–4.22 (m, 1H, CH (*$CH_2\underline{CH}(OH)CH_2$*)), 5.81 (br. s., 2H, OH), 6.90 (d, $^1J_{HH}$ = 6.0 Hz, 2H, $CH_{arom.}$), 7.37 (d, $^1J_{HH}$ = 8.8 Hz, 2H, $CH_{arom.}$), 8.53 (br. s., 1H, NH_2 (*$CH_2\underline{NH_2}CH_2$*)), 9.12 (br. s., 1H, NH (*piperidine*)), 9.44 (s, 1H, NH (*$CH_3OCO\underline{NH}$*)). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 10.9, 16.8, 26.6, 30.4, 39.7, 49.9, 51.1, 51.4, 51.5, 57.5, 64.8, 70.0, 114.7, 119.8, 132.6, 153.7, 154.1. HR-MS (Orbitrap): $C_{20}H_{33}N_3O_4$ $[M+H]^+$ calculated 380.2549 *m/z*, found 380.2544 *m/z*.

*4.2.5. Synthesis of compound **14***

*4.2.5.1. 4-(2-Methoxy)ethoxybenzoic acid (**14a**).* A mixture of ethyl-4-hydroxybenzoate (3.32 g, 0.02 mol), 2-methoxyethyl 4-methylbenzenesulfonate [59] (0.02 mol) and potassium carbonate (0.06 mol) in acetone (25 mL) was heated at 70 °C for 8 h and then stirred for 12 h at ambient temperature. The precipitation was then filtered and acetone was evaporated. The residue was dissolved in EtOAc and washed with 2 M NaOH and water, dried over anhydrous $MgSO_4$, and then the solvent was evaporated. The crude product was heated for 2 h with 5 M NaOH (50 mL) at 100 °C. The reaction mixture was washed with CH_3Cl and neutralized with concentrated HCl. The resulting white precipitate was collected by filtration. Yield: 71%, R_f: 0.67 (EtOAc), m.p. 148–151 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.63 (bs, 1H, COOH), 7.88 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar-$H^{2,6}$), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar-$H^{3,5}$), 4.18–4.13 (m, 2H, $ArOCH_2$), 3.69–3.64 (m, 2H, -CH_2OCH_3), 3.30 (s, 3H, -OCH_3). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 166.8, 161.9, 131.2, 122.9, 114.2, 70.1, 67.1, 58.1.

*4.2.5.2. (Oxiran-2-yl)methyl 4-methoxyethoxybenzoate (**14b**).* A mixture of acid **14a** (0.028 mol) in methanol (75 mL) and KOH (2.2 g, 0.042 mol) in *i*-PrOH (50 mL) was stirred for 1 h at ambient temperature, and after that, *i*-PrOH (175 mL) was added for the final ratio MeOH/*i*-PrOH 1:3. The resulting white precipitate was collected by filtration and dried under low pressure. This potassium salt with (oxiran-2-yl)methyl 4-methylbenzensulfonate [60] (3.5 g, 0.015 mol) in DMF (50 mL) was heated for 7 h at 70 °C. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in EtOAc and washed with water. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, and solvent removed under reduced pressure and a crude compound was purified by column flash chromatography. Yield: 69%, R_f: 0.60 (EtOAc/petroleum ether 1:1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 7.92 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar-$H^{2,6}$), 7.07 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar-$H^{3,5}$), 4.60 (dd, J = 12.4, 2.7 Hz, 1H, $COOCH_2$), 4.20–4.16 (m, 2H, $ArOCH_2$), 4.04 (dd, J = 12.04, 6.4 Hz, 1H, $COOCH_2$), 3.69–3.65 (m, 2H, CH_2OCH_3), 3.34–3.30 (m, 4H, -OCH_3 + CH-oxirane), 2.86–2.81 (m, 1H, CH_2-oxirane), 2.72 (dd, J = 5.0, 2.6 Hz, 1H, CH_2-oxirane). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 165.0, 162.5, 131.2, 121.5, 114.4, 70.1, 67.2, 64.9, 58.1, 48.9, 43.8.

*4.2.5.3. [2-(2,6-Dimethoxyfenoxy)ethyl]{2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethoxy)benzoyloxy]propyl} ammonium fumarate (**14**).* Oxirane **14b** (0.004 mol) was added to the solution of the corresponding phenoxyethylamine (0.004 mol) in *i*-PrOH (15 mL). The reaction mixture was heated at 80 °C for 1 h and stirred then for 72 h at ambient temperature. Afterwards, the reaction mixture was cooled for at least 48 h at −18 °C. The precipitate was filtered off and dissolved in Et_2O and transformed to its fumaric salt by addition of an excess of a saturated solution of fumaric acid in Et_2O. This new precipitate was filtered off and recrystallized from *i*-PrOH, if necessary. Yield: 49%, R_f: 0.49 (MeOH), m.p. 118–121 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 7.95 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, Ar-$H^{2,6}$), 7.04–7.01 (m, 3H, OAr-$H^{3,5}$ + NAr-H^4), 6.67 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, NAr-$H^{3,5}$), 6.50 (s, 2H, fumarate), 4.22–4.04 (m, 7H, -CH_2OAr + -$COOCH_2CH$- + -$NH_2^+CH_2\underline{CH_2}O$-), 3.77 (s, 6H, $ArOCH_3$), 3.68–3.67 (m, 2H, -CH_2CH_2OAr), 3.31 (s, 3H, -OCH_3), 3.07–2.92 (m, 4H, -$\underline{CH_2}NH_2^+\underline{CH_2}$-). ^{13}C NMR (DMSO-$d_6$) δ 167.6, 165.3, 162.4, 153.1, 135.7, 134.9, 131.4,

124.0, 121.9, 114.3, 105.4, 70.1, 69.9, 67.2, 66.5, 65.9, 58.2, 55.8, 50.6, 47.7. HR-MS (Orbitrap): $C_{25}H_{33}NO_{10}$ [M − H]⁻ calculated 506.2043 *m/z*, found 506.2044 *m/z*.

4.2.6. Synthesis of compound **15**

*4.2.6.1. Methyl 2-(2-methoxyethoxy)benzoate (**15a**).* 1-chloro-2-methoxyethane (0.48 mol) was added to the mixture of methyl 2-hydroxybenzoate (0.40 mol), K_2CO_3 (0.80 mol), KI (0.04 mol) and DMF (150 mL). The mixture was heated for 6 h at 150 °C. The solution was cooled and filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in $CHCl_3$ and extracted with water and 10% NaOH. The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$ and filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Yield: 96%, R_F: 0.78 (EtOAc/petroleum ether 1:1).

*4.2.6.2. 2-(2-Methoxyethoxy)benzoic acid (**15b**).* Ester **15a** (0.27 mol) was heated for one hour with an excess of 10% NaOH (0.58 mol). After cooling down to room temperature, the reaction mixture was neutralized with HCl and extracted into $CHCl_3$. The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$, and solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by fractional vacuum distillation. Yield: 93%, R_f: 0.52 (acetone/petroleum ether 1:1), b.p. (3–6 torr) 170–171 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 10.94 (bs, 1H, -COOH), 8.18–8.13 (m, 1H, -H6), 7.59–7.51 (m, 1H, -H4), 7.18–7.04 (m, 2H, -H3 + -H5), 4.39–4.35 (m, 2H, $ArOCH_2$-), 3.83–3.79 (m, 2H, -CH_2OMe), 3.46 (s,3H, -OMe). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 165.4, 157.4, 134.7, 133.6, 122.5, 118.7, 113.5, 69.9, 69.3, 59.0.

*4.2.6.3. (2R)-oxiran-2-ylmethyl 2-(2-methoxyethoxy)benzoate (**15c**).* 2-(2-methoxyethoxy)benzoyl chloride (0.028 mol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 and was added to the mixture of 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 0.028 mol), (*S*)-(−)-glycidol (0.028 mol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) under an inert atmosphere. The solution was stirred at ambient temperature for 3 h. The reaction mixture was then filtered and the filtrate washed with 10% HCl. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The crude compound was purified by column flash chromatography. Yield: 88%, R_f: 0.63 (acetone/CH_2Cl_2 1:20), $[\alpha]_D$ −14.82. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 7.87–7.82 (m, 1H, -H6), 7.51–7.42 (m, 1H, -H4), 7.04–6.95 (m, 2H, -H3 + -H5), 4,64–4.57 (m, 1H, -H7), 4.22–4.13 (m, 3H, $ArOCH_2$ + -H8), 3.84–3.79 (m, 2H, -CH_2OMe), 3.46 (s, 3H, -OMe), 3.37–3.29 (m, 1H, -H9), 2.90–2.86 (m, 1H, -H10), 2.78–2.74 (m, 1H,-H11). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 165.9, 158.7, 133.62, 131.8, 120.65, 120.45, 114.0, 71.0, 68.9, 65.11, 59.2, 49.5, 44.7.

*4.2.6.4. (2R)-N-tert-butyl-2-hydroxy-3-{[2-(2-methoxyethoxy)benzoyl]oxy}propan-1-aminium hemifumarate (**15**).* Epoxide **15c** (2.8 mmol) was dissolved in *i*-PrOH, and an excess of *tert*-butylamine was added to the solution. The mixture was heated at 70 °C for 1.5 h, after that the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 72 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the resulting amines were converted to the fumarate salts by dissolving the amine bases in diethylether and mixing with a solution of fumaric acid in diethylether. Crystalline products were filtered and recrystallized from *i*-PrOH. Yield: 57%, R_f: 0.43 (EtOAc/Et_2NH 10:1), $[\alpha]_D$ 14.64, m.p. 123–125 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 7.74–7.69 (m, 1H, -H6), 7.57–7.48 (m, 1H, -H4), 7.18–7.14 (m, 1H, -H3), 7.07–6.99 (m, 1H, -H5), 6.42 (s, 2H, CH=CHfumarate), 4.21–4.05 (m, 5H, Ar-OCH_2 + $COOCH_2CH(OH)$-), 3.69–3.64 (m, 2H, -CH_2OMe), 3.31 (s, 3H, -OMe), 3.06–2.75 (m, 2H, -CH_2NH-), 1,24 (s, 9H, -$CH(CH_3)_3$). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 168.9, 165.4, 157.55, 135.4, 133.4, 130.8, 120.4, 120.3, 114.0, 70.2, 68.2, 66.4, 65.45, 58.3, 54.3, 44.2, 25.65. HR-MS (Orbitrap): $C_{21}H_{32}NO_9$ [M − H]⁻ calculated 440.1926 *m/z*, found 440.1934 *m/z*.

4.3. SphK1 inhibition assays

Putative inhibitors were evaluated with fluorescence SphK assays in 384-well plate format as described [63]. Briefly, compounds were dissolved in DMSO and initially screened at 650 μM; those showing inhibition were further characterized to obtain IC50s. Assays contained 100 nM recombinant SphK1, 30 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.05% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% triton X-100, and 1% DMSO. All reactions were prepared as master mixes, dispensed into 384-well polypropylene plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), and allowed to pre-equilibrate at 37 °C for 10 min. Reactions were initiated with 20× ATP-Mg (20 mM ATP, 200 mM MgCl2, 900 mM Tris-HCl, pH 7.4), and were followed in a TECAN Infinite M1000 fluorescence plate reader (Männedorf, Switzerland) at 37 °C. Excitation wavelength was 550 nm and emission wavelength was 584 nm with a 5 nm band-pass. All data were analyzed using Prism (GraphPad, La Jolla, USA).

4.4. Molecular modelling

4.4.1. Virtual screening

Receptor preparation and docking setup were carried out with AutoDock Tools [64]. All operations involving format conversion, filtering, and manipulation of ligand molecules (including ligand preparation for docking) were performed with OpenBabel [48].

Docking calculations were all performed with Autodock Vina [46]. ROC curves were constructed by using the ROCR package [75] from R software [76]. The logistic regression model to filter out the "non X-ray like" poses from the ensemble of docking poses was constructed within Octave scientific programming environment [77].

4.4.2. Molecular docking

AutoDock4 [64] was used to dock each compound to the SphK1 active site using a Lamarckian genetic algorithm with pseudo-Solis and Wets local search [78]. The following parameters were used: the initial population of trial ligands was constituted by 150 individuals; the maximum number of generations was set to 2.7×10^4. The maximum number of energy evaluations was 25.0×10^6. For each docking job, 100 conformations were generated. All other run parameters were maintained at their default setting. The resulting docked conformations were clustered into families by considering the backbone rmsd. The lowest docking-energy conformation was considered the most favorable orientation [79].

4.4.3. MD simulations

The complex geometries from docking were soaked in boxes of explicit water using the TIP3P model [80] and subjected to MD simulation. All MD simulations were performed with the Amber software package [65] using periodic boundary conditions and cubic simulation cells. The particle mesh Ewald method (PME) [81] was applied using a grid spacing of 1.2 Å, a spline interpolation order of 4 and a real space direct sum cutoff of 10 Å. The SHAKE algorithm was applied allowing for an integration time step of 2 fs. MD simulations were carried out at 310 K temperature. Three MD simulations of 50 ns were conducted for each system under different starting velocity distribution functions; thus, in total 150 ns were simulated for each complex. The NPT ensemble was employed using Berendsen coupling to a baro/thermostat (target pressure 1 atm, relaxation time 0.1 ps). Post MD analysis was carried out with program PTRAJ.

4.4.4. Quantum calculations setup

Reduced 3D model systems including the tested compound and the interacting residues from Sphk1 binding pocket were constructed from the MD simulation. In this work, we identified the binding site residues of the receptors by using the free energy decomposition approach (MM/GBSA). The side chains of the binding site residues that contributed with a $|\Delta G|$ higher than 1.0 kcal/mol in the per residue energy decomposition together with each inhibitor were included in the reduced model.

4.4.5. Atoms in molecules theory

The reduced models were used as input for quantum theory of atoms in molecules (QTAIM) analysis [82], which was performed with the help of Multiwfn software [83]. The wave function used as input for these calculations were computed with the Gaussian 09 package [84] by employing the B3LYP functional with dispersion correction (B3LYP-D) and 6-31G(d) as basis set. The empirical dispersion correction for the B3LYP functional was applied by invoking the IOp 3/124 = 3 keyword in Gaussian 09. This type of calculations have been used in recent works because it ensures a reasonable compromise between the wave function quality required to obtain reliable values of the derivatives of $\rho(r)$ and the computer power available, due to the extension of the system in study [85,86].

4.5. Additional materials

FITC-annexin and propidium iodide staining solution were from BD Bioscience (San Jose, CA). Unless stated, all other reagents were from Sigma-Aldrich.

Acknowledgements

Grants from Universidad Nacional de San Luis: Número (UNSL): PROICO 2-1214 partially supported this work. Marcela Vettorazzi thanks a doctoral fellowship of CONICET-Argentina. This work was supported in part by NIH grants (K22 CA187314-01 to S.L. and R01GM043880 to S.S), by IGA VFU Brno 315/2015/FaF, 323/2016/FaF, 323/2017/FaF, by the institutional support RVO: 68081715 of the Institute of Analytical Chemistry of the CAS, v.v.i., by the Slovak Research and Development Agency (Grant No. APVV-0516-12), by Colombian Institute for Science and Research (COLCIENCIAS, Grant No. 1102-658-42651) and by Universidad de Jaén. This publication utilizes also research results of the CEBV project (ITMS 26240120034). Technical and human support provided by CICT of Universidad de Jaén (UJA, MINECO, Junta de Andalucía, FEDER) is gratefully acknowledged. This study was also supported by SANOFI-AVENTIS Pharma Slovakia, s.r.o.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.017.

References

[1] V.A. Blaho, T. Hla, Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors, Chem. Rev. 111 (2011) 6299–6320, http://dx.doi.org/10.1021/cr200273u.
[2] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 139–150, http://dx.doi.org/10.1038/nrm2329.
[3] S. Ponnusamy, M. Meyers-Needham, C.E. Senkal, S.A. Saddoughi, D. Sentelle, S.P. Selvam, A. Salas, B. Ogretmen, Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance, Future Oncol. 6 (2010) 1603–1624, http://dx.doi.org/10.2217/fon.10.116.
[4] S. Spiegel, S. Milstien, The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity, Nat. Rev. Immunol. 11 (2011) 403–415, http://dx.doi.org/10.1038/nri2974.
[5] M. Maceyka, S. Spiegel, Sphingolipid metabolites in inflammatory disease, Nature 510 (2014) 58–67. http://dx.doi.org/10.1038/nature13475.
[6] S. Pyne, N.J. Pyne, Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology, Trends Mol. Med. 17 (2011) 463–472, http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.002.
[7] D. Pchejetski, T. Bohler, J. Stebbing, J. Waxman, Therapeutic potential of targeting sphingosine kinase 1 in prostate cancer, Nat. Rev. Urol. 8 (2011) 569–678, http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2011.117.
[8] L.A. Heffernan-Stroud, L.M. Obeid, Sphingosine kinase 1 in cancer, Adv. Cancer Res. 117 (2013) 201–235, http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394274-6.00007-8.
[9] Y.I. Rodriguez, L.E. Campos, M.G. Castro, A. Aladhami, C.A. Oskeritzian, S.E. Alvarez, Sphingosine-1 phosphate: a new modulator of immune plasticity in the tumor microenvironment, Front. Oncol. 6 (2016) 218, http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2016.00218.
[10] C.R. Gault, L.M. Obeid, Still benched on its way to the bedside: sphingosine kinase 1 as an emerging target in cancer chemotherapy, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 46 (2011) 342–351, http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2011.597737.
[11] M.R. Pitman, S.M. Pitson, Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics, Curr. Cancer Drug Targets 10 (2010) 354–367, http://dx.doi.org/10.2174/1568210203706850096.
[12] N.J. Pyne, F. Tonelli, K.G. Lim, J. Long, J. Edwards, S. Pyne, Targeting sphingosine kinase 1 in cancer, Adv. Biol. Regul. 52 (2012) 31–38, http://dx.doi.org/10.1016/j.advenzreg.2011.07.001.
[13] N.J. Pyne, F. Tonelli, K.G. Lim, J.S. Long, J. Edwards, S. Pyne, Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer, Biochem. Soc. Trans. 40 (2012) 94–100, http://dx.doi.org/10.1042/BST20110602.
[14] N.J. Pyne, S. Pyne, Sphingosine 1-phosphate and cancer, Nat. Rev. Cancer 10 (2010) 489–503, http://dx.doi.org/10.1038/nrc2875.
[15] J.S. Long, J. Edwards, C. Watson, S. Tovey, K.M. Mair, R. Schiff, V. Natarajan, N.J. Pyne, S. Pyne, Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells, Mol. Cell. Biol. 30 (2010) 3827–3841, http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01133-09.
[16] J.W. Antoon, B.S. Beckman, Sphingosine kinase: a promising cancer therapeutic target, Cancer Biol. Ther. 11 (2011) 647–650.
[17] T. Kawamori, T. Kaneshiro, M. Okumura, S. Maalouf, A. Uflacker, J. Bielawski, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis, FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 23 (2009) 405–414, http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-117572.
[18] A. Weigert, S. Schiffmann, D. Sekar, S. Ley, H. Menrad, C. Werno, S. Grosch, G. Geisslinger, B. Brune, Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype, Int. J. Cancer 125 (2009) 2114–2121, http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24594.
[19] K. Shirai, T. Kaneshiro, M. Wada, H. Furuya, J. Bielawski, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, B. Ogretmen, T. Kawamori, A role of sphingosine kinase 1 in head and neck carcinogenesis, Cancer Prev. Res. (Phila) 4 (2011) 454–462, http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0299.
[20] M. Bao, Z. Chen, Y. Xu, Y. Zhao, R. Zha, S. Huang, L. Liu, T. Chen, J. Li, H. Tu, X. He, Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma, Liver Int. 32 (2012) 331–338, http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02666.x.
[21] L.A. Heffernan-Stroud, K.L. Helke, R.W. Jenkins, A.-M. De Costa, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Defining a role for sphingosine kinase 1 in p53-dependent tumors, Oncogene 31 (2012) 1166–1175, http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.302.
[22] V. Albinet, M.-L. Bats, A. Huwiler, P. Rochaix, C. Chevreau, B. Segui, T. Levade, N. Andrieu-Abadie, Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells, Oncogene 33 (2014) 3364–3373, http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.303.
[23] S. Ponnusamy, S.P. Selvam, S. Mehrotra, T. Kawamori, A.J. Snider, L.M. Obeid, Y. Shao, R. Sabbadini, B. Ogretmen, Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis, EMBO Mol. Med. 4 (2012) 761–775, http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201200244.
[24] M. Kohno, M. Momoi, M.L. Oo, J.-H. Paik, Y.-M. Lee, K. Venkataraman, Y. Ai, A.P. Ristimaki, H. Fyrst, H. Sano, D. Rosenberg, J.D. Saba, R.L. Proia, T. Hla, Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation, Mol. Cell. Biol. 26 (2006) 7211–7223, http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02341-05.
[25] J.-P. Truman, M. Garcia-Barros, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism, Biochim. Biophys. Acta 1841 (2014) 1174–1188, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.013.
[26] K.A. Orr Gandy, L.M. Obeid, Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors, Biochim. Biophys. Acta 1831 (2013) 157–166, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.002.
[27] K. Takabe, S.W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets, Pharmacol. Rev. 60 (2008) 181–195, http://dx.doi.org/10.1124/pr.107.07113.
[28] Z. Wang, X. Min, S.-H. Xiao, S. Johnstone, W. Romanow, D. Meininger, H. Xu,

J. Liu, J. Dai, S. An, S. Thibault, N. Walker, Molecular basis of sphingosine kinase 1 substrate recognition and catalysis, Structure 21 (2013) 798–809, http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2013.02.025.
[29] D.J. Gustin, Y. Li, M.L. Brown, X. Min, M.J. Schmitt, M. Wanska, X. Wang, R. Connors, S. Johnstone, M. Cardozo, A.C. Cheng, S. Jeffries, B. Franks, S. Li, S. Shen, M. Wong, H. Wesche, G. Xu, T.J. Carlson, M. Plant, K. Morgenstern, K. Rex, J. Schmitt, A. Coxon, N. Walker, F. Kayser, Z. Wang, Structure guided design of a series of sphingosine kinase (SphK) inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 4608–4616, http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.030.
[30] J. Wang, S. Knapp, N.J. Pyne, S. Pyne, J.M. Elkins, Crystal structure of sphingosine kinase 1 with PF-543, ACS Med. Chem. Lett. 5 (2014) 1329–1333, http://dx.doi.org/10.1021/ml5004074.
[31] S.W. Paugh, B.S. Paugh, M. Rahmani, D. Kapitonov, J.A. Almenara, T. Kordula, S. Milstien, J.K. Adams, R.E. Zipkin, S. Grant, S. Spiegel, A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia, Blood 112 (2008) 1382–1391, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-02-138958.
[32] K.J. French, R.S. Schrecengost, B.D. Lee, Y. Zhuang, S.N. Smith, J.L. Eberly, J.K. Yun, C.D. Smith, Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase, Cancer Res. 63 (2003) 5962–5969.
[33] T.P. Mathews, A.J. Kennedy, Y. Kharel, P.C. Kennedy, O. Nicoara, M. Sunkara, A.J. Morris, B.R. Wamhoff, K.R. Lynch, T.L. MacDonald, Discovery, biological evaluation, and structure-activity relationship of amidine based sphingosine kinase inhibitors, J. Med. Chem. 53 (2010) 2766–2778, http://dx.doi.org/10.1021/jm901860h.
[34] Y. Xiang, B. Hirth, J.L.J. Kane, J. Liao, K.D. Noson, C. Yee, G. Asmussen, M. Fitzgerald, C. Klaus, M. Booker, Discovery of novel sphingosine kinase-1 inhibitors. Part 2, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 4550–4554, http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.019.
[35] D.J. Baek, N. MacRitchie, N.J. Pyne, S. Pyne, R. Bittman, Synthesis of selective inhibitors of sphingosine kinase 1, Chem. Commun. 49 (2013) 2136–2138, http://dx.doi.org/10.1039/C3CC00181D.
[36] M.E. Schnute, M.D. McReynolds, T. Kasten, M. Yates, G. Jerome, J.W. Rains, T. Hall, J. Chrencik, M. Kraus, C.N. Cronin, M. Saabye, M.K. Highkin, R. Broadus, S. Ogawa, K. Cukyne, L.E. Zawadzke, V. Peterkin, K. Iyanar, J.A. Scholten, J. Wendling, H. Fujiwara, O. Nemirovskiy, A.J. Wittwer, M.M. Nagiec, Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1, Biochem. J. 444 (2012) 79–88, http://dx.doi.org/10.1042/BJ20111929.
[37] N.N. Patwardhan, E.A. Morris, Y. Kharel, M.R. Raje, M. Gao, J.L. Tomsig, K.R. Lynch, W.L. Santos, Structure–Activity relationship studies and in vivo activity of guanidine-based sphingosine kinase inhibitors: discovery of SphK1- and SphK2-selective inhibitors, J. Med. Chem. 58 (2015) 1879–1899, http://dx.doi.org/10.1021/jm501760d.
[38] M.R. Pitman, M. Costabile, S.M. Pitson, Recent advances in the development of sphingosine kinase inhibitors, Cell. Signal 28 (2016) 1349–1363, http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.06.007.
[39] Y. Gao, F. Gao, K. Chen, M. Tian, D. Zhao, Sphingosine kinase 1 as an anticancer therapeutic target, Drug Des. devel. Ther. 9 (2015) 3239–3245, http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S83288.
[40] J. Newton, S. Lima, M. Maceyka, S. Spiegel, Revisiting the sphingolipid rheostat: evolving concepts in cancer therapy, Exp. Cell Res. 333 (2015) 195–200, http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.025.
[41] W.L. Santos, K.R. Lynch, Drugging sphingosine kinases, ACS Chem. Biol. 10 (2015) 225–233, http://dx.doi.org/10.1021/cb5008426.
[42] M. Pellecchia, Fragment-based drug discovery takes a virtual turn, Nat. Chem. Biol. 5 (2009) 274–275. http://dx.doi.org/10.1038/nchembio0509-274.
[43] W. Zheng, S.R. Johnson, I. Baskin, J. Bajorath, D. Horvath, C. Laggner, T. Langer, G. Schneider, D. Filimonov, V. Poroikov, I. Tetko, H. Van De Waterbeemd, T. Oprea, E. Radchenko, V. Palyulin, N. Zefirov, L. Peltason, G. Wolber, D. Schuster, J. Kirchmair, E. Proschak, Y. Tanrikulu, A. Varnek, A. Tropsha, Chemoinformatics approaches to virtual screening, R. Soc. Chem. (2008), http://dx.doi.org/10.1039/9781847558879.
[44] N. Triballeau, H.-O. Bertrand, F. Acher, Are you sure you have a good model?, in: Pharmacophores and Pharmacophore Searches, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, pp. 325–364, http://dx.doi.org/10.1002/3527609164.ch15.
[45] A. Gaulton, L.J. Bellis, A.P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani, J.P. Overington, ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery, Nucleic Acids Res. 40 (2012) D1100–D1107, http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr777.
[46] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, J. Comput. Chem. 31 (2010) 455–461, http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334.
[47] J.J. Sutherland, R.K. Nandigam, J.A. Erickson, M. Vieth, Lessons in molecular recognition. 2. Assessing and improving cross-docking accuracy, J. Chem. Inf. Model 47 (2007) 2293–2302, http://dx.doi.org/10.1021/ci700253h.
[48] N.M. O'Boyle, M. Banck, C.A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, G.R. Hutchison, Open Babel: an open chemical toolbox, J. Cheminform 3 (2011) 33, http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-3-33.
[49] L. Stanzel, I. Malik, P. Mokry, Preliminary *in vitro* investigation of antioxidant potential of ultra short acting arylcarbamoyloxy-aminopropanols containing *N*-phenylpiperazine moiety, Dhaka Univ. J. Pharm. Sci. 15 (2016) 235–239, http://dx.doi.org/10.3329/dujps.v15i2.30943.
[50] I. Malík, M. Janoščová, P. Mokrý, J. Csöllei, F. Andriamainty, Basic physicochemical characterization of new potential ultrashort acting β_1-adrenoceptor blockers, Acta Fac. Pharm. Univ. Comen 56 (2009) 119–127.
[51] I. Malik, M. Bukovsky, P. Mokrý, J. Csöllei, Antimicrobial profile investigation of potential ultrashort acting beta-adrenoceptor blocking compounds containing *N*-phenylpiperazine moiety, Glob. J. Med. Res. 13 (2013) 1–4.
[52] L.M. Acosta-Quintero, J. Jurado, M. Nogueras, A. Palma, J. Cobo, Synthesis of pyrimidine-fused benzazepines from 5-Allyl-4,6-dichloropyrimidines, Eur. J. Org. Chem. 2015 (2015) 5360–5369, http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201500632.
[53] J. Tengler, I. Kapustíková, M. Peško, R. Govender, S. Keltošová, P. Mokrý, P. Kollár, J. OMahony, A. Coffey, K. Králová, Jampílek, Synthesis and Biological evaluation of 2-Hydroxy-3-[(2-aryloxyethyl)amino]propyl 4-[(alkoxycarbonyl)amino]benzoates, Sci. World J. 2013 (2013) 274570, http://dx.doi.org/10.1155/2013/274570.
[54] J. Tengler, I. Kapustíková, O. Stropnický, P. Mokrý, M. Oravec, J. Csöllei, J. Jampílek, Synthesis of new (arylcarbonyloxy)aminopropanol derivatives and the determination of their physico-chemical properties, Cent. Eur. J. Chem. 11 (2013) 1757–1767, http://dx.doi.org/10.2478/s11532-013-0302-8.
[55] P. Marvanova, T. Padrtova, T. Pekarek, J. Brus, J. Czernek, P. Mokry, O. Humpa, M. Oravec, J. Jampilek, Synthesis and characterization of new 3-(4-Arylpiperazin-1-yl)-2-hydroxypropyl 4-propoxybenzoates and their hydrochloride salts, Molecules 21 (2016), http://dx.doi.org/10.3390/molecules21060707.
[56] L.M. Gaster, A.J. Jennings, G.F. Joiner, F.D. King, K.R. Mulholland, S.K. Rahman, S. Starr, P.A. Wyman, K.A. Wardle, (1-Butyl-4-piperidinyl)methyl 8-amino-7-chloro-1,4-benzodioxane-5-carboxylate hydrochloride: a highly potent and selective 5-HT4 receptor antagonist derived from metoclopramide, J. Med. Chem. 36 (1993) 4121–4123, http://dx.doi.org/10.1021/jm00077a018.
[57] J. Lalut, B.B. Tournier, T. Cailly, C. Lecoutey, S. Corvaisier, A. Davis, C. Ballandonne, M. Since, P. Millet, F. Fabis, P. Dallemagne, C. Rochais, Synthesis and evaluation of novel serotonin 4 receptor radiotracers for single photon emission computed tomography, Eur. J. Med. Chem. 116 (2016) 90–101, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.059.
[58] V. Kettmann, J. Csöllei, E. Račanská, P. Švec, Synthesis and structure-activity relationships of new β-adrenoreceptor antagonists. Evidence for the electrostatic requirements for β-adrenoreceptor antagonists, Eur. J. Med. Chem. 26 (1991) 843–851. http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234(91)90127-9.
[59] S.T. Koelsch, C.F. Rolfson, Synthesis of certain 3,4-disubstituted piperidines, J. Amer. Chem. Soc. 72 (1950) 1871–1873.
[60] A. Ammazzalorso, R. Amoroso, G. Bettoni, M. Fantacuzzi, B. De Filippis, L. Giampietro, C. Maccallini, D. Paludi, M.L. Tricca, Synthesis and antibacterial evaluation of oxazolidin-2-ones structurally related to linezolid, Farmaco 59 (2004) 685–690, http://dx.doi.org/10.1016/j.farmac.2004.05.002.
[61] D.R. Dewar, G.H. Kapur, H. Mottram, Some potential α-adrenoreceptor blocking 1,4-benzodioxanes and 2,6-dimethoxyphenoxyethylamines, Eur. J. Med. Chem. 18 (1983) 286–290.
[62] P. Marvanova, T. Padrtova, K. Odehnalova, O. Hosik, M. Oravec, P. Mokry, Synthesis and determination of physicochemical properties of new 3-(4-Arylpiperazin-1-yl)-2-hydroxypropyl 4-alkoxyethoxybenzoates, Molecules 21 (2016), http://dx.doi.org/10.3390/molecules21121682.
[63] S. Lima, S. Milstien, S. Spiegel, A real-time high-throughput fluorescence assay for sphingosine kinases, J. Lipid Res. 55 (2014) 1525–1530, http://dx.doi.org/10.1194/jlr.D048132.
[64] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791, http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256.
[65] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Goetz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, AMBER 12 OR - University of California, San Francisco, (2012). citeulike-article-id:10779586.
[66] S.A. Andújar, R.D. Tosso, F.D. Suvire, E. Angelina, N. Peruchena, N. Cabedo, D. Cortés, R.D. Enriz, Searching the "biologically relevant"conformation of dopamine: a computational approach, J. Chem. Inf. Model 52 (2012) 99–112, http://dx.doi.org/10.1021/ci2004225.
[67] R.D. Tosso, S.A. Andújar, L. Gutiérrez, E. Angelina, R. Rodríguez, M. Nogueras, H. Baldoni, F.D. Suvire, J. Cobo, R.D. Enriz, Molecular modeling study of dihydrofolate reductase inhibitors. Molecular dynamics simulations, quantum mechanical calculations, and experimental corroboration, J. Chem. Inf. Model 53 (2013) 2018–2032, http://dx.doi.org/10.1021/ci400178h.
[68] J. Parraga, N. Cabedo, S. Andújar, L. Piqueras, L. Moreno, A. Galán, E. Angelina, R.D. Enriz, M.D. Ivorra, M.J. Sanz, D. Cortes, 2,3,9- and 2,3,11-trisubstituted tetrahydroprotoberberines as D2 dopaminergic ligands, Eur. J. Med. Chem. 68 (2013) 150–166, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.07.036.
[69] E.L. Angelina, S.A. Andújar, R.D. Tosso, R.D. Enriz, N.M. Peruchena, Non-covalent interactions in receptor–ligand complexes. A study based on the electron charge density, J. Phys. Org. Chem. 27 (2014) 128–134, http://dx.doi.org/10.1002/poc.3250.
[70] J. Parraga, S.A. Andújar, S. Rojas, L.J. Gutiérrez, N. El Aouad, M.J. Sanz, R.D. Enriz, N. Cabedo, D. Cortes, Dopaminergic isoquinolines with hexahydrocyclopenta[ij]-isoquinolines as D2-like selective ligands, Eur. J.

Med. Chem. 122 (2016) 27–42, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.009.
[71] D.R. Adams, S. Pyne, N.J. Pyne, Sphingosine kinases: emerging structure-function insights, Trends biochem. Sci. 41 (2016) 395–409, http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.02.007.
[72] M.J. Pulkoski-Gross, J.C. Donaldson, L.M. Obeid, Sphingosine-1-phosphate metabolism: a structural perspective, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 50 (2015) 298–313, http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2015.1039115.
[73] R. Parthasarathi, V. Subramanian, N. Sathyamurthy, Hydrogen bonding without Borders: an atoms-in-molecules perspective, J. Phys. Chem. A 110 (2006) 3349–3351, http://dx.doi.org/10.1021/jp060571z.
[74] S. Witek, J. Bielawski, A. Bielawska, Synthesis of N-(Formylphenyl)- and N-(Acetophenyl) derivatives of urea and carbamic acid, J. Für Prakt. Chem. 321 (1979) 804–812, http://dx.doi.org/10.1002/prac.19793210512.
[75] T. Sing, O. Sander, N. Beerenwinkel, T. Lengauer, ROCR: visualizing classifier performance in R, Bioinformatics 21 (2005) 3940–3941, http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti623.
[76] R Development Core Team, R: a language and environment for statistical computing, R. Found. Stat. Comput. (2011). ISBN: 3-900051-07-0, http://www.r-project.org/.
[77] R.W. John, W. Eaton, David Bateman, Søren Hauberg, GNU Octave version 3.8.1 manual: a high-level interactive language for numerical computations, Creat. Indep. Publ. Platf. (2014). Item 26.4, http://www.gnu.org/software/octave/doc/interpreter/.
[78] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, J. Comput. Chem. 19 (1998) 1639–1662, http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19, 14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B.
[79] T.J.A. Ewing, I.D. Kuntz, Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening, J. Comput. Chem. 18 (1997) 1175–1189, http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19970715)18, 9<1175::AID-JCC6>3.0.CO;2-O.
[80] P. Mark, L. Nilsson, Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/e water models at 298 K, J. Phys. Chem. A 105 (2001) 9954–9960, http://dx.doi.org/10.1021/jp003020w.
[81] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: an N·log(N) method for Ewald sums in large systems, J. Chem. Phys. 98 (1993).
[82] R.F.W. Bader, Atoms in molecules, Acc. Chem. Res. 18 (1985) 9–15, http://dx.doi.org/10.1021/ar00109a003.
[83] T. Lu, F. Chen, Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer, J. Comput. Chem. 33 (2012) 580–592, http://dx.doi.org/10.1002/jcc.22885.
[84] M. J. Frisch and G. W. Trucks and H. B. Schlegel and G. E. Scuseria and M. A. Robb and J. R. Cheeseman and G. Scalmani and V. Barone and B. Mennucci and G. A. Petersson and H. Nakatsuji and M. Caricato and X. Li and H. P. Hratchian and A. F. Izmaylov and, J. A. and J. E. P. and F. O. and M. B. and J. J. H. and E. B. and K. N. K. and V. N. S. and R. K. and J. N. and K. R. and A. R. and J. C. B. and S. S. I. and J. T. and M. C. and. (2009). Gaussian 09. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
[85] E.E. Barrera Guisasola, L.J. Gutierrez, S.A. Andujar, E. Angelina, A.M. Rodriguez, R.D. Enriz, Pentameric models as alternative molecular targets for the design of new antiaggregant agents, Curr. Protein Pept. Sci. 17 (2016) 156–168.
[86] A.M. Luchi, E.L. Angelina, S.A. Andujar, R.D. Enriz, N.M. Peruchena, Halogen bonding in biological context: a computational study of D2 dopamine receptor, J. Phys. Org. Chem. 29 (2016) 645–655, http://dx.doi.org/10.1002/poc.3586.

Journal of Computer-Aided Molecular Design
https://doi.org/10.1007/s10822-018-0129-7

Theoretical models to predict the inhibitory effect of ligands of sphingosine kinase 1 using QTAIM calculations and hydrogen bond dynamic propensity analysis

Marcela Vettorazzi[1,2] · Cintia Menéndez[3] · Lucas Gutiérrez[1,2] · Sebastián Andujar[1,2] · Gustavo Appignanesi[3] · Ricardo D. Enriz[1,2]

Received: 19 March 2018 / Accepted: 2 July 2018

Abstract

We report here the results of two theoretical models to predict the inhibitory effect of inhibitors of sphingosine kinase 1 that stand on different computational basis. The active site of SphK1 is a complex system and the ligands under the study possess a significant conformational flexibility; therefore for our study we performed extended simulations and proper clusterization process. The two theoretical approaches used here, hydrogen bond dynamics propensity analysis and Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM) calculations, exhibit excellent correlations with the experimental data. In the case of the hydrogen bond dynamics propensity analysis, it is remarkable that a rather simple methodology with low computational requirements yields results in excellent accord with experimental data. In turn QTAIM calculations are much more computational demanding and are also more complex and tedious for data analysis than the hydrogen bond dynamic propensity analysis. However, this greater computational effort is justified because the QTAIM study, in addition to giving an excellent correlation with the experimental data, also gives us valuable information about which parts or functional groups of the different ligands are those that should be replaced in order to improve the interactions and thereby to increase the affinity for SphK1. Our results indicate that both approaches can be very useful in order to predict the inhibiting effect of new compounds before they are synthesized.

Keywords Sphingosine kinase inhibitors · QTAIM calculations · Hydrogen bond dynamic propensity analysis · Theoretical approaches

Introduction

Sphingosine-1-phosphate is a potent sphingolipid mediator [1–4], and the kinase that produces it, Sphingosine Kinase 1 (SphK1) has been implicated in cancer progression, inflammation and cardiovascular diseases [5, 6].

✉ Ricardo D. Enriz
denriz@unsl.edu.ar

1 Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco, 915, 5700 San Luis, Argentina

2 IMIBIO-CONICET, UNSL, Chacabuco 915, 5700 San Luis, Argentina

3 INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Av. Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina

The first crystal structure of SphK1 was reported in 2013 [7], such report presents the atomic structure of SphK1 in complexes that expanded the mechanistic understanding of this important pharmacological target. This information has provided a crucial baseline from which to generate predictions and targeted modifications that further probe the many nuances of functional elements in SphK1 activity and regulation. More recently two SphK1 co-crystal structures (4L02 and 4V24) with potent inhibitory compounds have also been published [8, 9]. These structures provide useful structural information on the interaction of ligands at the active site of SphK1. The structure of SphK1 provides a structural framework to understand how many unrelated residues are involved. Within the cavity, sphingosine is proposed to be guided into position by a tunneling mechanism that is driven by energetically favorable interactions between nonpolar cavity residues and aliphatic carbons long the sphingosine tail group [10]. The pocket itself is revealed not as a

Published online: 03 July 2018

simple tunnel but is rather J-shaped, allowing bulky groups like those possessed by the inhibitors **SKI-II** [11], **1v2** [8] and **PF-543** [12] nestle within the cavity and competitively occlude substrate binding [10].

Although the crystal structure of SphK1 is a stepping key to new perspectives in our quest to resolve the cellular function and regulation of this key enzyme, however, as is often the case, from this information new questions and doubts are arising. Further structural studies might explain the seemingly contradictory observation that some SphK1 inhibitors [13, 14] markedly affect cell growth and survival, whereas a potent and selective inhibitor did not [12].

To further improve SphK inhibitors, particularly regarding potency and selectivity, it is necessary to continue to probe the binding pockets of SphK1 with structurally diverse sets of molecules. In this line we have recently reported two new series of compounds possessing different structural scaffolds [15]. Such compounds were obtained from a virtual screening and among these new compounds; molecules **1**–**3** (Fig. 1) displayed the strongest inhibitory effects in this series. Although the inhibitory activity of these compounds is only moderated in comparison to **PF-543**, it should be noted that such compounds were obtained from a primary virtual screening and therefore the activity obtained is more than acceptable. It is clear that one of our main objectives is to increase the potency of these new compounds through the introduction of structural changes. However the question that arises is: what are the changes that must be made on these structures, and how we can know before their synthesis if these compounds are going to be as active as we expect. This task demands the availability of accurate theoretical approaches to assess the inhibitory activity of potential inhibitors. A first step in this regard would be to test the efficiency of some existing techniques we have already applied in other contexts in the evaluation of the inhibitory activity of our new compounds on SphK1 along with other already existing inhibitors. If we are successful in correlating their theoretical predictions on SphK1 with experimental data, these techniques might be useful for selecting new compounds generated from such scaffolds with potentially improved inhibitory effect prior to their synthesis. Moreover, we also expect that the knowledge gained from the application of such techniques might provide us with additional clues to re-engineer this new family of compounds.

Computational methods

Receptor preparation

The X-ray crystal structure of SphK1 was taken from the Protein Data Bank with the accession code 3VZD. The C chain was used. The SKI-II inhibitor and the water molecules were removed; only the ADP, Mg^{2+} and a water molecule (that makes hydrogen-bond interactions with Asp178 and Ser168) is left since it is considered structural part of the

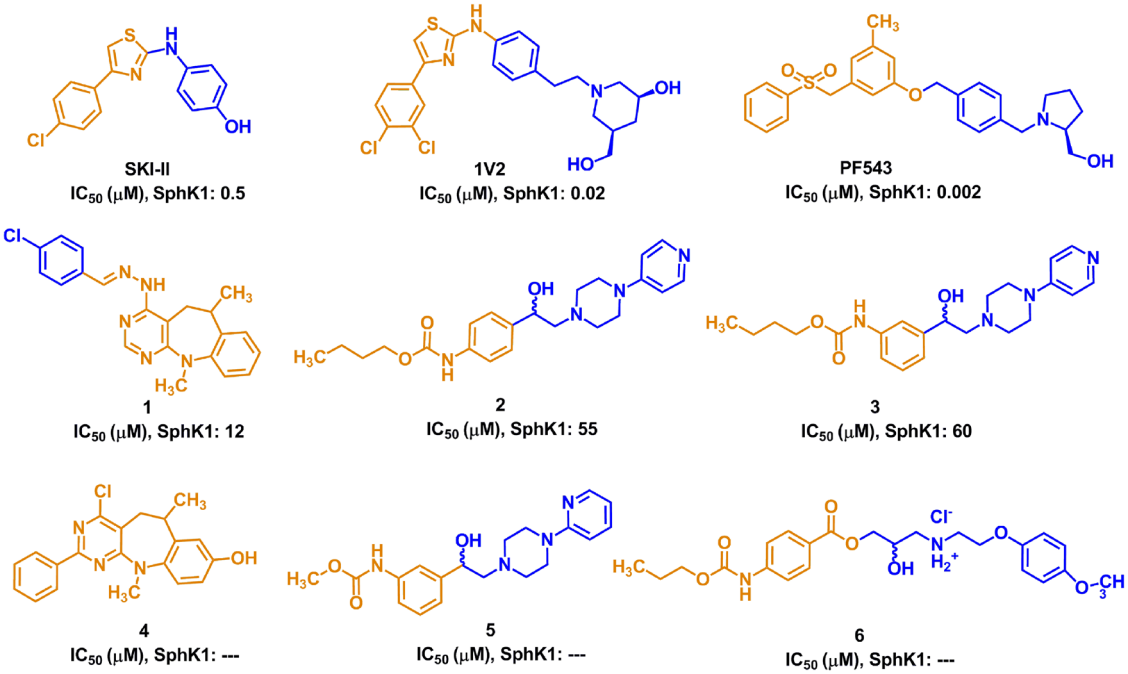


Fig. 1 Structural features of the compounds studied here. The polar head of each molecule has been marked in blue and their respective hydrophobic tails are shown in orange color (online version to see the colors)

protein [7]. Ionizable groups were assumed as its ionization state at pH 7.0.

Docking procedure

The docking simulations were carried out using of AutoDock 4.2 [16]. In all experiments the following parameters were used: the initial population of trial ligands was constituted by 200 individuals; the maximum number of generations was set to 270,000. The maximum number of energy evaluations was 10.0×10^6. All other run parameters were maintained at their default setting. The 3D affinity map was a cube with $46 \times 46 \times 48$ points separated by 0.375 Å and centered at the active site of SphK1. The resulting docked conformations were clustered into families by the backbone Root-Mean-Square Deviation (RMSD). The lowest docking-energy conformation of each family was considered the most favorable orientation.

Refinement of the anchoring

After the docking calculations, leading lowest energy structures were refined by performing molecular dynamics simulations, using the Amber14 packages [17]. The molecular dynamics simulations (MD) were performing using the all-atom force field ff99SB [18] to describe the receptor whereas the general Amber force field (GAFF) [19] was used to handle small organic molecules and the force field parameters of the inhibitors were produced by the antechamber program in Amber. Each model was soaked in a truncated octahedral periodic box of TIP3P water molecules [20]. The distance between the edges of the water box and the closest atom of the solutes was at least 10 Å. Sodium ions were added to neutralize the charge of the system. The entire system was subjected to energy minimization.

To remove possible bumps, the geometry of the system went through an energy minimization process with 10,000 steps of a conjugate gradient method: (i) In the first 5000 steps, only the backbone atoms of the complex were constrained with 10 kcal/(mol $Å^2$) force constants. (ii) In the last 5000 steps, the solute and solvent atoms were allowed to move without any constraint. The relaxed geometry resulted in a backbone RMSD < 0.5 Å from the reference crystal structure.

In the next place each system was then heated in the NVT ensemble from 0 to 300 K in 500 ps and equilibrated at an isothermal isobaric (NPT) ensemble for another 2 ns. A Langevin thermostat [21] was used for temperature coupling with a collision frequency of 1.0 ps^{-1}. The particle mesh Ewald (PME) method was employed to treat the long-range electrostatic interactions in a periodic boundary condition [22]. The SHAKE method was used to constrain hydrogen atoms. The time step for all MD is 2 fs, with a direct-space, non-bonded cutoff of 8 Å. Three MD simulations of 50 ns were conducted for each system under different starting velocity distribution functions; thus, in total 150 ns were simulated for each complex.

It should be noted that compounds **2, 3, 5** and **6** possess one chiral center, and are therefore enantiomeric with the possibility of two isomers (R and S). However, we did not perform an enantiomeric resolution for the previously reported biological assays [15]; thus, the racemic mix was used in each case. For the molecular modeling study, only one isomer of each compound was evaluated in our MD simulations and later computations. To choose the isomeric forms of each compound, we considered preliminary and specially performed exploratory simulations determining the spatially preferred form for these compounds. Our preliminary and exploratory docking and short MD simulations (three runs of 5 ns each) indicate that the spatial ordering adopted by the R-forms gives a more adequate orientation of the molecules to interact in the active site of SphK1. Thus, on the basis of such results the R-forms were chosen for the simulations.

Binding energy calculations

The MM-PBSA and MM-GBSA protocol was applied to each MD trajectory in order to calculate the relative binding energies of the SphK1–INH complexes. The MM-PBSA and MM-GBSA method was used in a hierarchical strategy, and the details of this method have been presented elsewhere [23]. This protocol was applied to 27,000 equidistant snapshots extracted from the last 45.0 ns of the dynamics in triplicate and was used within the one-trajectory approximation. Briefly, the binding free energy (ΔG_{bind}) resulting from the formation of a RL complex between a ligand (L) and a receptor (R) is calculated as:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (1)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{internal} + \Delta E_{electrostatic} + \Delta E_{vdW} \quad (2)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \quad (3)$$

where ΔE_{MM}, ΔG_{sol}, and $-T\Delta S$ are the changes in the gas-phase MM energy, the solvation free energy, and the conformational entropy upon binding, respectively. ΔE_{MM} includes $\Delta E_{internal}$ (bond, angle, and dihedral energies), $\Delta E_{electrostatic}$ (electrostatic), and ΔE_{vdw} (van der Waals) energies. ΔG_{solv} is the sum of electrostatic solvation energy (polar contribution), ΔG_{PB}, and the non-electrostatic solvation component (nonpolar contribution), ΔG_{SA}. Polar contribution is calculated using the PB model, while the nonpolar energy is estimated by solvent accessible surface area. The conformational entropy change $-T\Delta S$ is usually computed by normal-mode analysis, but in this study the entropy contributions

were not calculated due to the computational cost involved in such calculations.

Cluster

To perform clustering we used the Cpptraj program, part of the AmberTools package. 135 ns was analyzed for each complex, discarding the initial 5 ns of each dynamic. A total of 27,000 frames was evaluated. Ten representative pdb structures was obtained for each complex from a separation by using RMSD, which was ordered from highest to lowest population. For each complex, several representative pdb structures were analyzed from QTAIM methods; thus, we calculate the necessary number of structures to reach 50% of the population.

Atoms in molecules theory

The wave functions of the inhibitors bound to the binding site residues residues that have at least one heavy atom within 5 Å from the ligand molecule (first shell residues), generated at the M062X/6-31G(d) level of theory, were subjected to a Quantum Theory Atoms In Molecules (QTAIM) analysis [24] using Multiwfn software [25]. This type of calculations have been used in recent works because it ensures a reasonable compromise between the wave function quality required to obtain reliable values of the derivatives of $\Sigma\rho_{(r)}$ and the computer power available, due to the extension of the systems in study [26–29].

For each complex, several pdb structures corresponding to 50% of the population were analyzed. The $\Sigma\rho(r)$ obtained for each interaction between Receptor and Ligand (R–L) was averaged and then all the interactions were added to obtain a final value of $\Sigma\rho(r)$.

Hydrogen bond dynamic propensity analysis

Dynamic propensities (fraction of time formed) of BHBs belonging to the binding site of SphK1 were calculated over a total of 27,000 MD configurations (three replicas of 45 ns), in all complexes studied. At each evaluation time (configuration), if a pair of residues *i* and *j* of a certain BHBs satisfy a hydrogen bonding criterion (N–O cutoff distance, $r < 3.5°$ Å; N–H–O cutoff angle, $\theta > 140°$), the corresponding interaction becomes 1, while it is 0 otherwise. Then, we averaged the results for all configurations evaluated and so we obtained the fractions of time that each BHBs remain formed in each case. Finally, for each BHB we calculated D-values how the difference between dynamic formation propensity and its corresponding state-value (formed or not formed according to the same criterion of distance and angle) in the PDB structure (in absolute value). For more details see "Results and discussion" section.

Results and discussion

Nine compounds were selected for this study: three well-known inhibitors (**PF-543, 1v2** and **SKI-II**) for which experimental structural data are available (Protein Data Bank (PDB) code 4V24 [9], 4L02 [8] and 3VZD [7], respectively) and six compounds recently reported by us [15]. Among these, three active compounds (**1**–**3**) as positive controls and three inactive compounds (**4**–**6**) were selected to provide negative controls (Fig. 1).

We have previously performed molecular dynamics simulations in different biological systems with different degrees of structural complexity like for example D2 dopamine receptor (D2DR) [30–34], dihydrofolate reductase (DHFR) [35, 36], Acetylcholinesterase (AchE) [37, 38], beta secretase (BACE 1) [39, 40]. In the case of simulations at the D2 dopamine receptor, three simulations of 10 ns each have been shown to be sufficient to obtain satisfactory results [30–34]. However, the degree of structural complexity and other factors that have a direct influence on this type of simulations are different for the active site of Sphingosine Kinase 1 with respect to the active site of D2DR. A comparative study between the active sites of these two receptors is summarized in Table 1; such study was carried out analyzing the following aspects: (a) size and depth of the

Table 1 Parameters considered analyzing both the active sites of the molecular targets as well the R–L complexes

	D2	SphK1
Solvent accessible surface area (SASA) (Å^2)	489	721
Buried area (Å^2)	428	675
Number of mainly interactions stabilizing or destabilizing the complexes	From 3 to 6	More than 10
Flexibility of the active site	Markedly reduced (Tight)	Large
Flexibility of the ligand	Partially restricted (two rotations)	Very flexible (more than 10 rotations)
Types of interactions involved in the complex formation	Ionic, hydrogen bonds and hydrophobic	Ionic, pi stacking and hydrophobic
Structural variations on the ligands	From scarce to significant	High variability

active site; (b) number of the main interactions stabilizing or destabilizing the complexes; (c) flexibility of the active site; (d) flexibility of the ligand; (e) types of interactions involved in the complex formation and (f) structural variability of the different ligands.

A numerical study on the Solvent Access Surface Area (SASA) [41] was used to evaluate the size and depth (buried) of the active site. As can be seen in Table 1, the SASA and buried obtained for Sphingosine Kinase 1 is almost twice to those obtained for D2DR. This information by itself is significant to see that the complexity of the active site of Sphingosine Kinase 1 is much greater than that of D2DR. However, all the aspects analyzed here show that the Receptor–Ligand (R–L) complexes in Sphingosine Kinase are more intricate and complicated to study than those R–L complexes of D2DR. Those that show greater differences are the number of interactions involved as well as the flexibility and structural variability of the ligands (see Table 1). On the basis of this information, we decided to extend the simulations for this system performing three simulations of 50 ns each (150 ns for the three full simulations).

Our first attempt was try to find a correlation between the binding energies obtained through the Generalized Born surface area (GBSA) and Poisson–Boltzmann surface area (PBSA) calculations with the experimental data (IC_{50}) (Fig. 2). Unfortunately the results by using GBSA were very poor. Not only because the value of r is very low (r = 0.53), but also because these results do not allow to clearly differentiate between the most active compounds with respect to those less active. Note, for example, that the SKI-II compound that is very active has a very high energy value. In turn PBSA calculations give a better result with respect to GBSA giving an r value of 0.69; however such result is still insufficient. It should be noted that the bad fitting when using GBSA and PBSA methods might partly due to the lack of inclusion of entropy. As previously indicated, the active site of SphK1 is large and has some flexibility; furthermore, the ligands by themselves are also quite flexible and can be moved sufficiently before to fit into the binding pocket. Thus, the entropy contribution could be significant for this particular enzyme and therefore at least in part the unsatisfying performance of these calculations might because entropy is turned off and not because of the method itself. However it is clear that these theoretical techniques without consideration of entropy fail to show a good performance in predicting the activity of new compounds (not yet synthesized) for

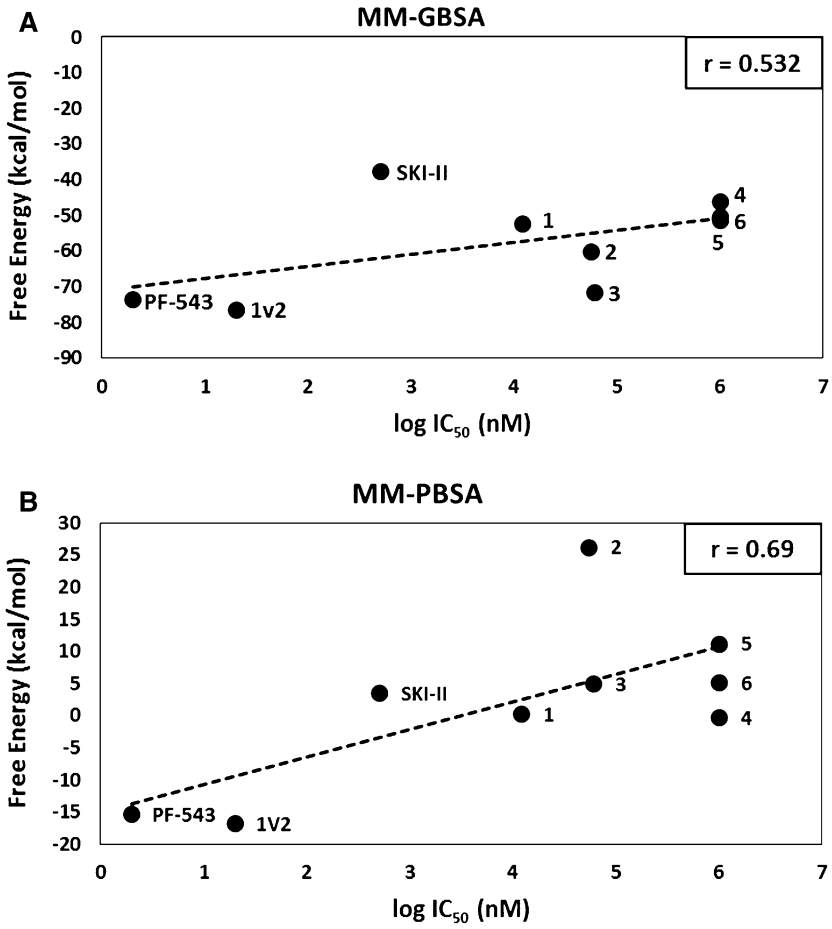


Fig. 2 Correlation obtained for the different compounds between the experimental data (IC_{50}) and the binding energy obtained from **a** MM-GBSA and **b** MM-PBSA calculations

this molecular target. Thus, we decided to try two different techniques that have given satisfactory results in other biological systems. Thus, we used Quantum Theory of Atoms In Molecules (QTAIM) [24] calculations and also performed a study of the dynamic propensity of backbone hydrogen bonds [42, 43].

QTAIM calculations

Studies using QTAIM calculations have been carried out by our research group with great success in various biological systems [31–36, 39, 40]. In fact QTAIM calculations have already been used previously in complexes of Sphingosine Kinase 1, but in that case they were used for another purpose [15]. In reference 15 the QTAIM calculations were used only to analyze the different interactions that stabilized the complexes of the most representative compounds of the series and compare them with the interactions of the complex SphK1/**PF-543**.

It is important to note that QTAIM calculations are performed on a determinate geometry, while the R–L binding come from an ensemble of conformations. Therefore, to understand the activity of these compounds it would be convenient to analyze several conformations of each R–L complex. Thus, the first doubt that arose was how many different structures for each complex would be necessary consider. To solve this problem, we performed a clusterization process on the trajectories of MD. As preliminary and exploratory analysis, we made different tests with the three complexes of which we had crystallographic data (**SKI-II, 1v2** and **PF-543**). The results obtained for these exploratory calculations are shown in Table 2.

Although all the correlations obtained between the experimental data and the QTAIM analysis for these three compounds were acceptable, significant differences were found depending on how many structures were considered. If we only consider the three structures reported experimentally, the result obtained is just acceptable (r = 0.74). This result improves if we take into account the more populated file of the cluster (r = 0.86). In turn, the correlation improves significantly if we consider 50% of the files of the clusterization process, obtaining an r value of 0.95. It is interesting to note that this correlation is good enough to consider that it would have good predictive power. If we consider 100% of the cluster, the value improves even more (r = 0.98). It should be noted, however, that performing these calculations considering 100% of the cluster represents highly demanding task in terms of calculation time and the analysis of results. Therefore we consider that using 50% of the cluster is a good compromise between calculation accuracy degree and computational demand. Based on the above results, the QTAIM study was carried out considering 50% of the clustering process (for more details see methods section).

Figure 3 shows that an excellent correlation was obtained (r = −0.95) for the complete series by using QTAIM calculations. This study allows to differentiate perfectly between the most active compounds (**SKI-II, 1v2** and **PF-543**), compounds with moderate activity (**1, 2** and **3**) and the inactive compounds (**4, 5** and **6**). On the other hand, the obtained correlation is good enough to expect good predictive power for this type of ligands. It is important to note that the QTAIM study also allows us to determine which portions of the molecules should be modified to increase their affinity for SphK1. This can be observed from Fig. 4. In this figure the interactions produced by the polar part of the molecules

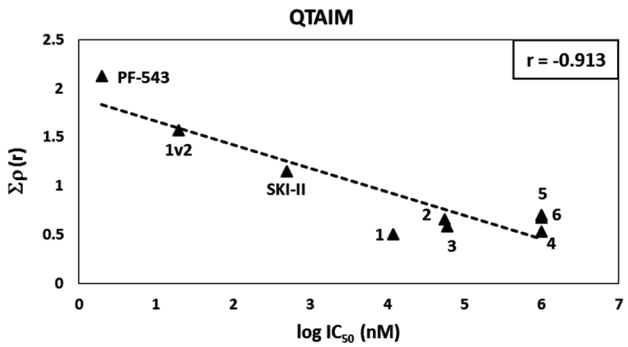


Fig. 3 Correlation obtained by using QTAIM calculations for the whole series

Table 2 Different correlations between experimental data (IC_{50}) and Σρ(r)(a.u.) values (QTAIM calculations) obtained for compounds SKI-II, 1v2 and PF-543

Ligand	IC_{50} (nM)	log IC_{50}	Crystallographic structure	More populated[a]	50% CLUSTER[b]	100% CLUSTER[c]
SKI-II	500	2.699	0.227	0.178	0.425	1.146
1v2	20	1.301	0.495	0.478	0.716	1.567
PF-543	2	0.301	0.413	0.441	1.412	2.123
r			−0.743	−0.858	−0.947	−0.985

[a]More populated corresponds to the structure of the leader of the most populated cluster

[b]50% cluster corresponds to the leading structures that represent 50% of the population

[c]100% cluster corresponds to the 10 structures obtained through the clustering process

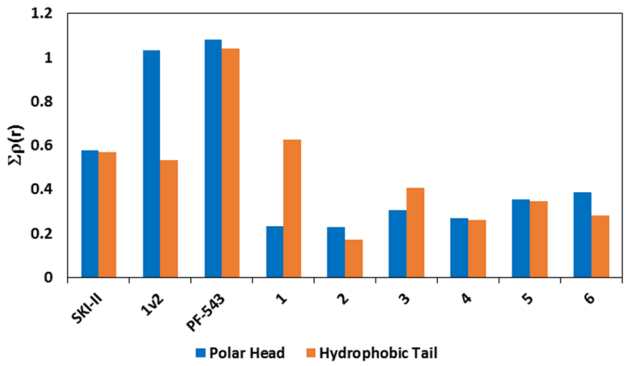


Fig. 4 Charge density values for the total interactions of the polar head (blue stacked bars) and the hydrophobic portion (orange stacked bars) for **SKI-II, 1v2, PF-543** (more active compounds), compounds **1**–**3** (less active molecules) and compounds **4**–**6** (inactive molecules). The repulsive short C–H•••H–C contacts were not included (Online version to see the colors)

(blue color) have been differentiated from those produced by the hydrophobic tail of the compounds (orange color). Observing this figure it is evident that the active compounds have stronger interactions than the less active compounds. It is interesting to note that the compound **PF-543** has very strong interactions both in the area of the cationic head and in the hydrophobic tail. This clearly explains its high affinity for the active site of Sphingosine Kinase 1 and therefore its inhibitory activity (it is the strongest inhibitor reported to date). Comparing the Σρ(r) values obtained for **1v2** and **PF-543** it can be seen that the interactions in the zones of the cationic heads of these compounds are comparable; however there is a noticeable difference in the interactions of the hydrophobic tail. In this case, the interactions observed for **PF-543** are significantly stronger than those of **1v2** and therefore they are explaining the stronger activity of **PF-543**.

If we compare the Σρ(r) values obtained for **SKI-II** and **PF-543**, it is evident that both the cationic head zone and the hydrophobic tail of **PF-543** establish more interactions and stronger ones than those obtained for **SKI-II**, which is in total agreement with the experimental data. On the other hand, the compounds previously reported by us (**1**–**3**) present significantly weaker interactions in both portions of the receptor, indicating that it is necessary to introduce structural changes in both parts of the ligand in order to obtain a greater inhibitory activity. Once again these results are supported by the experimental data.

Considering the most active compound reported by our group (compound **1**) it can be seen that the interactions in the hydrophobic tail of this compound are more than acceptable. In fact, these interactions are greater than those found for **1v2** and **SKI-II**. However, the interactions obtained for the polar head of compound **1** are markedly weaker than those found for **1v2** and **SKI-II** and this would explain the lower inhibitory effect of compound **1** with respect to **1v2** and **SKI-II**. In contrast, the results obtained for compounds **2** and **3** suggest that the interactions that should be increased are those of the hydrophobic portion (orange zone) (Figs. 4, 5).

Regarding the results obtained for the inactive compounds (**4**–**6**), it is possible to observe that, in general, the interactions of these compounds are the weakest. The case of compound **4** is very particular, because it adopts a different spatial arrangement from the rest of the compounds and can only establish interactions with the hydrophobic zone of the active site (orange zone in Fig. 5). This different behavior could explain its lack of activity.

If we compare the interactions obtained for compounds **5** and **6** with the more active compounds (**SKI-II, 1v2** and **PF-543**), the differences are very marked. However, this difference is only subtle when the interactions are compared with those of compound **3**. In fact, although the interactions of compound **3** are slightly larger, this difference is very small. There are at least two possible explanations for this situation: (a) it should be noted that although compound **3** is considered active, its activity could be considered almost marginal ($IC_{50} = 60$ μM) (b) these compounds are chiral. Whereas racemic mixtures were used for the bioassays, only the R enantiomer, which is the preferred form (see methods section), was used for the simulations. This situation could introduce some "noise" that is not possible to evaluate so satisfactorily through these simulations. Despite this, it is evident that the QTAIM analysis gives an excellent correlation with the experimental data. This information is extremely useful, since it indicates which part of the molecule should be modified in order to increase its inhibitory activity against SphK1.

Dynamic propensity study of backbone hydrogen bonds

As a supplementary approach, we now study the dynamic propensity of the backbone hydrogen bonds of the protein SphK1 in order to determine its binding properties. This approach has been fostered by the observation that certain backbone hydrogen bonds (BHB), mainly those belonging to binding sites in several apo proteins, exhibit a dynamical propensity in simulations that differs markedly form their state-value (that is, formed/not formed) in the reported PDB structure. This fact makes them appealing as targets for protein local stabilization upon ligand binding [42, 43]. The dynamic propensity study of BHBs represents a simple method that has been accounted for in detail in previous works [42, 43], but for the sake of completeness we briefly describe it in what follows: Specifically, for each BHB of the apo protein we calculate the difference (D value) between its dynamics formation propensity (fraction of time formed

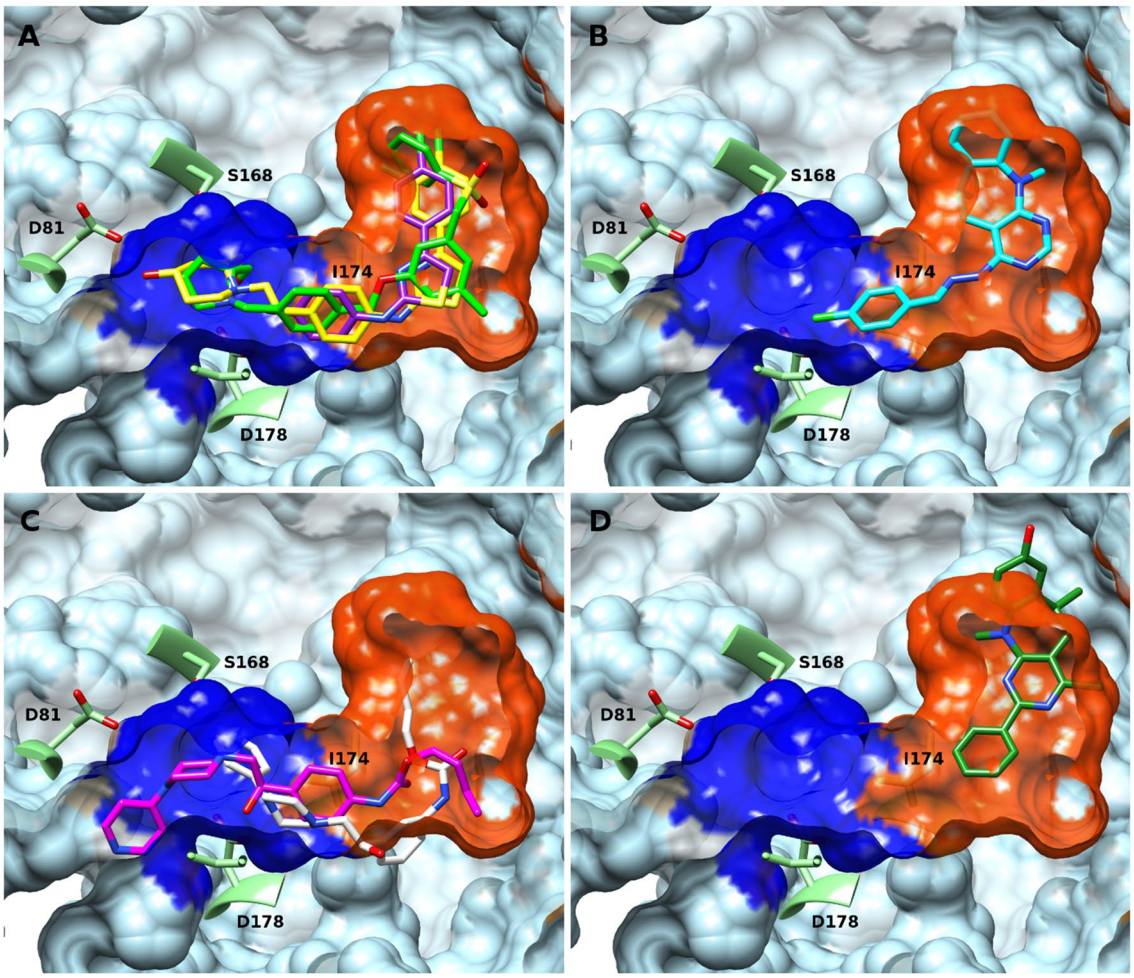


Fig. 5 Spatial view of the different ligands bonded in the binding pocket of SphK1. The blue and orange zones represent the cationic and hydrophobic portions of the active site, respectively. **a PF-543** (in green), **1v2** (in yellow) and **SKI-II** (in purple) superimposed. **b** Compound **1** (in cyan). **c** Compound **2** (magenta) and **3** (white) superimposed. **d** Compound **4** (dark green). Some of the main amino acids involved in the formation of the complexes receptor-ligand are also shown in this figure. The structures were taken from a clustering process in which the last 45 ns of each of the three simulations were considered. (online version to see the colors)

during a molecular dynamics trajectory) and its corresponding PDB-structure state-value. By analyzing the D values it is usually found that most BHBs of the PDB are stable during the dynamics (low distance value, D). However, certain BHBs do exhibit large D-values, corresponding either to interactions that are present in the PDB and tend to be disrupted during (part of) the dynamics or, less frequently, to interactions that while absent in the PDB are nonetheless persistently formed during the dynamics. Then, if the absolute value of D for a given BHB is above ½, we call it a C-HB reflecting the fact that such BHB tends to "change it state" from formed to mostly disrupted or from not formed to mostly formed between the PDB structure and the dynamics [42, 43]. Additionally, studies on the location of such C-HBs for a series of proteins have detected a clear enrichment of them in binding sites. In turn, previous studies on a series of protein–protein or protein–ligand complexes showed that most C-HBs are strongly stabilized in the complex form compared to the apo form, thus pointing to the fact that stabilization of C-HBs provides a driving force for binding [42]. In this sense, C-HBs embody motifs or regions of the protein whose stabilization depends on the establishment of a proper local context (usually involving water removal) provided by the ligand upon binding. Indeed, C-HBs stabilization has been proven in a quantitative way for a series of protein–protein and protein-drug complexes, obtaining good correlations with biding affinity experimental values [42]. It is interesting to point out that this method provides a complementary approach since it does not make emphasis on *direct* protein–ligand interactions, but rather on the local stabilization of the target protein binding site upon ligand binding.

We should note that in the present study it has not been possible to determine C-HBs exactly in the same way as in previous ones [42, 43] since we lack a comparable SphK1 apo structure. Indeed, there exist no experimentally obtained (NMR or X-ray) structure of apo SphK1 at exactly the same conditions as that for the different complexes reported and used in the present study (crystallized with ADP and Mg^{2+}). Thus, we generated an apo structure by removing the inhibitor SKI-II from the complex and we determine BHBs belonging to the binding site as that whose distance (measured form the N amide or the carbonyl O) to any heavy atom of the SKI-II in the complex (PDB: 3VZD) is less than 6 Å. Thereby, dynamic propensities of such BHBs were calculated over a total of 27,000 MD configurations (three replicas of 45 ns). Then all those BHBs that are found to be formed in less than half of the configurations analyzed (that is, D-value > 0.5) will be C-HBs. Table 3 shows the C-HBs considered, together with their corresponding D-values. It is important to mention that the BHB 303–299 was included although it does not meet strictly the established cut-off value since in two of the replicas its dynamic propensity is less than 0.5, while in the other one it is higher.

Subsequently, dynamic propensities for C-HBs in the complexes between SphK1 and the most active compounds were evaluated: **SK-II, 1v2** and **PF-543**. Table 4 shows DM values (average values of D), that is for each C-HBs we calculate the D-values and, then by averaging such quantities, we provide the DM-value. This table displays an excellent correlation between the experimental binding affinity data and DM-values for these three compounds. Dynamic propensities were evaluated in the same period of time that QTAIM calculations.

The Fig. 6 show also an excellent correlation for the complete series of compounds. This study, like the QTAIM study, enables us to differentiate the most active compounds (**SKI-II, 1v2** and **PF-543**) from compounds with moderate activity (**1, 2** and **3**) and inactive compounds (**4, 5** and **6**). However it is important to remark that the times demanded for the computer calculations as well as for the analysis of the results are significantly inferior in comparison to those required for the QTAIM analysis and therefore this technique could be very adequate for an exploratory analysis in this type of compounds.

Table 3 D-values for C-HBs belonging to binding site of SphK1

C-HBs		SphK1: APO form
nRES	nRES	D-values
178	174	0.841
181	177	0.561
272	269	0.762
303	299	0.391
302	298	0.546

Table 4 Correlation between experimental data (IC_{50}) and DM values obtained for compounds SKI-II, 1v2 and PF-543

Compound	IC_{50} (nM)	log (IC_{50})	DM (5–50 ns)
SKI-II	500	2.69897	0.532
1v2	20	1.30103	0.470
PF-543	2	0.30103	0.370
r			0.9736

Conclusions

Being able to predict the inhibitory activity of new compounds before being synthesized is certainly a highly desirable goal. For the specific case of SphK1 complexes, we here present two theoretical methods that stand on different computational basis that, in both cases yield excellent correlations with the experimental data. From these results, it is reasonable to expect that such methods might also present predictive ability for other structurally related compounds that have not been synthesized yet. In the case of the hydrogen bond dynamics propensity analysis, it is remarkable that a rather simple methodology with low computational requirements yields results in excellent accord with experimental data. In this respect, the excellent performance of QTAIM would be a priori more expected in terms of its more accurate description of the molecular interactions.

Comparing the two techniques used here, it is evident that QTAIM calculations are much more computational demanding (time consuming). With regard to CPU time, the relationship between the hydrogen bond dynamic propensity analysis and QTAIM calculations is 1 h versus 10 hs. But also QTAIM analysis requires a longer time in the preparation of the model system to study (prior to

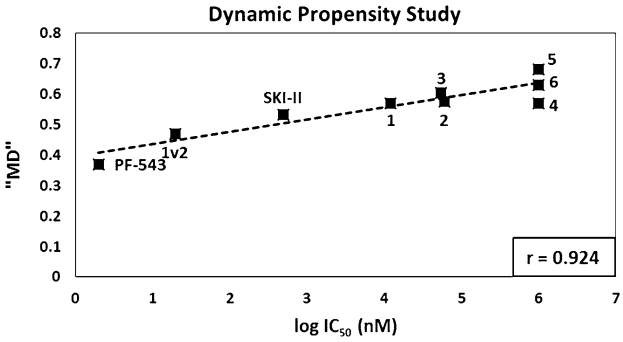


Fig. 6 Correlation between DM-value and experimental data (IC_{50}) for the whole series

the calculation) and especially in the final analysis of the interactions (after the calculation). Both processes are much more complex and tedious than those required for the hydrogen bond dynamic propensity analysis. However, this greater computational effort is justified because the QTAIM study, in addition to giving an excellent correlation with the experimental data, also gives us valuable information about which parts or functional groups of the different ligands are those that should be replaced in order to improve the interactions and thereby to increase the affinity for SphK1. Possibly, the main limitation in the use of QTAIM calculations for the analysis of interactions R–L, is that it is necessary to have the correct geometries for these complexes. It is good to keep in mind that the QTAIM study involves static calculations that are used to evaluate a dynamic process. Therefore, having many geometries (or at least the most representative) of each complex is fundamental, in order to obtain satisfactory results. In our study in order to guarantee this information, extensive DM simulations were carried out and a clusterization process was performed for the different complexes studied. It should be noted that the active site of SphK1 can be considered a relatively complex system; in turn the conformational flexibility of the ligands and the structural variety of the compounds impose a high degree of difficulty for molecular modeling of the systems under study. This requires performing extended simulations and proper clusterizations if we pretend to obtain satisfactory results.

In short, we report here two different theoretical approaches that exhibit excellent correlations with the experimental data and that we believe can be very useful in order to predict the inhibiting effect of new compounds before they are synthesized. At this moment we are analyzing and synthesizing new structurally related compounds by using the theoretical approaches reported here.

Acknowledgements Grants from Universidad Nacional de San Luis (UNSL-Argentina) partially supported this work. This work was supported in part by a grant from MinCyt (PICT-2015/1769). GAA and CAM acknowledge financial support from CONICET, UNS and MinCyt (PICT-2015/1893).

References

1. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. Biochim Biophys Acta 1585:193–201
2. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW et al (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. Biochim Biophys Acta 1758:2016–2026
3. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM (2006) A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. Biochim Biophys Acta 1758:2027–2036. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.018
4. Wattenberg BW (2010) Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. World J Biol Chem 1:362–368. https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i12.362
5. Ricci C, Onida F, Ghidoni R (2006) Sphingolipid players in the leukemia arena. Biochim Biophys Acta 1758:2121–2132. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.016
6. Cuvillier O (2002) Sphingosine in apoptosis signaling. Biochim Biophys Acta 1585:153–162
7. Wang Z, Min X, Xiao S-H et al (2013) Molecular basis of sphingosine kinase 1 substrate recognition and catalysis. Structure 21:798–809. https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.025
8. Gustin DJ, Li Y, Brown ML et al (2013) Structure guided design of a series of sphingosine kinase (SphK) inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 23:4608–4616. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.030
9. Wang J, Knapp S, Pyne NJ et al (2014) Crystal structure of sphingosine kinase 1 with PF-543. ACS Med Chem Lett 5:1329–1333. https://doi.org/10.1021/ml5004074
10. Lima S, Spiegel S (2013) Sphingosine kinase: a closer look at last. Structure 21:690–692. https://doi.org/10.1016/j.str.2013.04.006
11. French KJ, Schrecengost RS, Lee BD et al (2003) Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. Cancer Res 63:5962–5969
12. Schnute ME, McReynolds MD, Kasten T et al (2012) Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. Biochem J 444:79–88. https://doi.org/10.1042/BJ20111929
13. Paugh SW, Paugh BS, Rahmani M et al (2008) A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. Blood 112:1382–1391. https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138958
14. Orr Gandy KA, Obeid LM (2013) Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors. Biochim Biophys Acta 1831:157–166. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.002
15. Vettorazzi M, Angelina E, Lima S et al (2017) An integrative study to identify novel scaffolds for sphingosine kinase 1 inhibitors. Eur J Med Chem 139:461–481. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.017
16. Morris GM, Goodsell DS, Huey R, Olson AJ (1996) Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. J Comput Aided Mol Des 10:293–304
17. Case DA, Babin V, Berryman JT et al (2014) {Amber 14} OR, University of California, San Francisco
18. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K et al (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. Proteins 78:1950–1958. https://doi.org/10.1002/prot.22711
19. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW et al (2004) Development and testing of a general amber force field. J Comput Chem 25:1157–1174. https://doi.org/10.1002/jcc.20035
20. Mark P, Nilsson L (2001) Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. J Phys Chem A 105:9954–9960. https://doi.org/10.1021/jp003020w
21. Izaguirre JA, Catarello DP, Wozniak JM, Skeel RD (2001) Langevin stabilization of molecular dynamics. J Chem Phys 114:2090–2098. https://doi.org/10.1063/1.1332996
22. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML et al (1995) A smooth particle mesh Ewald method. J Chem Phys 103:31–34
23. Kollman PA, Massova I, Reyes C et al (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. Acc Chem Res 33:889–897. https://doi.org/10.1021/ar000033j
24. Bader RFW (1985) Atoms in molecules. Acc Chem Res 18:9–15. https://doi.org/10.1021/ar00109a003

25. Lu T, Chen F (2012) Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer. J Comput Chem 33:580–592. https://doi.org/10.1002/jcc.22885
26. Gutierrez LJ, Angelina E, Gyebrovszki A et al (2016) New small-size peptides modulators of the exosite of BACE1 obtained from a structure-based design. J Biomol Struct Dyn. https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1145143
27. Gutierrez LJ, Barrera Guisasola EE, Peruchena N, Enriz RD (2016) A QM/MM study of the molecular recognition site of bapineuzumab toward the amyloid-β peptide isoforms. Mol Simul. https://doi.org/10.1080/08927022.2015.1032276
28. Vega-Hissi EG, Tosso R, Enriz RD, Gutierrez LJ (2015) Molecular insight into the interaction mechanisms of amino-2H-imidazole derivatives with BACE1 protease: a QM/MM and QTAIM study. Int J Quantum Chem. https://doi.org/10.1002/qua.24854
29. Barrera Guisasola EE, Gutiérrez LJ, Salcedo RE et al (2016) Conformational transition of Aβ42 inhibited by a mimetic peptide. A molecular modeling study using QM/MM calculations and QTAIM analysis. Comput Theor Chem. https://doi.org/10.1016/j.comptc.2016.02.002
30. Luchi AM, Angelina EL, Andujar SA et al (2016) Halogen bonding in biological context: a computational study of D2 dopamine receptor. J Phys Org Chem 29:645–655. https://doi.org/10.1002/poc.3586
31. Parraga J, Cabedo N, Andujar S et al (2013) 2,3,9- and 2,3,11-trisubstituted tetrahydroprotoberberines as D2 dopaminergic ligands. Eur J Med Chem 68:150–166. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.07.036
32. Parraga J, Andujar SA, Rojas S et al (2016) Dopaminergic isoquinolines with hexahydrocyclopenta[ij]-isoquinolines as D2-like selective ligands. Eur J Med Chem 122:27–42. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.009
33. Andujar S, Tosso RD, Suvire FD et al (2012) Searching the "biologically relevant"conformation of dopamine: a computational approach. J Chem Inf Model 52:99–112. https://doi.org/10.1021/ci2004225
34. Angelina EL, Andujar SA, Tosso RD et al (2014) Non-covalent interactions in receptor–ligand complexes. A study based on the electron charge density. J Phys Org Chem 27:128–134. https://doi.org/10.1002/poc.3250
35. Tosso R, Vettorazzi M, Andujar A S, et al (2016) The electronic density obtained from a QTAIM analysis used as molecular descriptor. A study performed in a new series of DHFR inhibitors. J Mol Struct 1134:464–474
36. Tosso RD, Andujar SA, Gutierrez L et al (2013) Molecular modeling study of dihydrofolate reductase inhibitors. Molecular dynamics simulations, quantum mechanical calculations, and experimental corroboration. J Chem Inf Model 53:2018–2032. https://doi.org/10.1021/ci400178h
37. Ortiz JE, Garro A, Pigni NB et al (2018) Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of Hieronymiella species. Phytomedicine 39:66–74. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.020
38. Siano A, Garibotto FF, Andujar SA et al (2017) Molecular design and synthesis of novel peptides from amphibians skin acting as inhibitors of cholinesterase enzymes. J Pept Sci 23:236–244. https://doi.org/10.1002/psc.2974
39. Gutierrez LJ, Parravicini O, Sanchez E et al (2018) New substituted aminopyrimidine derivatives as BACE1 inhibitors: in silico design, synthesis and biological assays. J Biomol Struct Dyn. https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1424036
40. Gutierrez LJ, Angelina E, Gyebrovszki A et al (2017) New small-size peptides modulators of the exosite of BACE1 obtained from a structure-based design. J Biomol Struct Dyn 35:413–426. https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1145143
41. Durham E, Dorr B, Woetzel N et al (2009) Solvent accessible surface area approximations for rapid and accurate protein structure prediction. J Mol Model 15:1093–1108. https://doi.org/10.1007/s00894-009-0454-9
42. Menendez CA, Accordino SR, Gerbino DC, Appignanesi GA (2016) Hydrogen bond dynamic propensity studies for protein binding and drug design. PLoS ONE 11:e0165767. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165767
43. Menendez CA, Accordino SR, Gerbino DC, Appignanesi GA (2015) "Chameleonic" backbone hydrogen bonds in protein binding and as drug targets. Eur Phys J E 38:107. https://doi.org/10.1140/epje/i2015-15107-3

Received: 8 October 2018 | Revised: 28 November 2018 | Accepted: 5 December 2018
DOI: 10.1002/ardp.201800298

FULL PAPER

DPhG ARCH PHARM
Archiv der Pharmazie

Synthesis and biological evaluation of sphingosine kinase 2 inhibitors with anti-inflammatory activity

Marcela Vettorazzi[1] | Laura Vila[2,3] | Santiago Lima[4] | Lina Acosta[5] | Felipe Yépes[5] | Alirio Palma[5] | Justo Cobo[6] | Jan Tengler[7] | Ivan Malik[8] | Sergio Alvarez[1] | Patrice Marqués[2,3] | Nuria Cabedo[2,3] | María J. Sanz[2,3] | Josef Jampilek[8] | Sarah Spiegel[4] | Ricardo D. Enriz[1]

[1] Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL), San Luis, Argentina

[2] Department of Pharmacology, University of Valencia, Valencia, Spain

[3] Institute of Health Research INCLIVA University Clinic Hospital of Valencia, Valencia, Spain

[4] Department of Biology and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Virginia Commonwealth University School of Medicine, Richmond, Virginia

[5] Laboratorio de Síntesis Orgánica, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

[6] Inorganic and Organic Department, University of Jaén, Jaén, Spain

[7] Medis International a.s., Bolatice, Czech Republic

[8] Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Comenius University, Bratislava, Slovakia

Correspondence
Dr. Ricardo D. Enriz, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL), Chacabuco 915, 5700 San Luis, Argentina.
Email: denriz@unsl.edu.ar

Funding information
Universidad Nacional de San Luis; Colombian Institute for Science and Research, Grant number: 110265842651; CONICET-Argentina; Slovak Research and Development Agency, Grant number: APVV-0516-12; SANOFI-AVENTIS Pharma Slovakia; Spanish Ministry of Economy and Competiveness, Grant numbers: SAF2014-57845R, SAF2017-89714-R, CP15/00150; Carlos III Institute of Health (ISCIII); European Regional Development Fund; Spanish Ministry of Innovation and Competitiveness

Abstract

The synthesis of inhibitors of SphK2 with novel structural scaffolds is reported. These compounds were designed from a molecular modeling study, in which the molecular interactions stabilizing the different complexes were taken into account. Particularly interesting is that 7-bromo-2-(2-phenylethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-epoxynaphtho[1,2-*b*]azepine, which is a selective inhibitor of SphK2, does not exert any cytotoxic effects and has a potent anti-inflammatory effect. It was found to inhibit mononuclear cell adhesion to the dysfunctional endothelium with minimal impact on neutrophil–endothelial cell interactions. The information obtained from our theoretical and experimental study can be useful in the search for inhibitors of SphK2 that play a prominent role in different diseases, especially in inflammatory and cardiovascular disorders.

KEYWORDS
anti-inflammatory activity, bioassays, molecular modeling, sphingosine kinase 2 inhibitors, synthesis

1 | INTRODUCTION

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid mediator that is synthesized by two isoforms of sphingosine kinase (SphK1 and SphK2).[1,2] S1P regulates many important physiological functions; however, it also has a pathological role in autoimmune dysfunction, inflammation, cancer, and many other diseases.[3–7] Most of its actions are mediated by binding and signaling through a family of five G

protein-coupled receptors (S1PR1-5) leading to downstream signaling important in inflammation, immunity, and cancer.[8,9]

Although SphK1 and SphK2 share a high degree of homology, they differ in molecular weight, tissue distribution, and subcellular localization.[10] Specifically, SphK2 has an additional domain that shares no homology with SphK1.[11] Most of the research to date has been focused on SphK1 due to its strong link to cancer and inflammatory diseases.[12–14] The structural data reported by Wang and coworkers in 2013 on the active site of SphK1 has contributed to the understanding of its mechanism of action and development of SphK1 inhibitors.[15] Numerous inhibitors of SphK1 have been reported, including very potent ones, such as PF-543.[16] In contrast, much less is known regarding SphK2.

Attention on SphK2 increased greatly after the discovery of the immunosuppressant drug FTY720/Fingolimod. It is a prodrug that is phosphorylated *in vivo* by SphK2 to its active form FTY720-phosphate, a mimetic of S1P that modulates S1PR functions.[17] In addition, intracellular S1P generated by SphK2 is an endogenous inhibitor of histone deacetylases,[9] stabilizes telomerase[18] and in mitochondria, binds to prohibitin 2.[19] These studies indicate that SphK2 is involved in epigenetic regulation, aging, and mitochondrial respiratory complex function. Furthermore, SphK2 also regulates IL-2 pathways in T cells.[20] Therefore, it has been suggested that inhibitors of SphK2 may have therapeutic utility in inflammatory and/or autoimmune diseases.[20] However, despite these advances, much remains still unknown, regarding the physiological and pathological roles of this SphK isoenzyme. In order to better understand functions of SphK2 in autoimmune/inflammatory disease, there is a need to develop SphK2 inhibitors with selectivity over SphK1.

In contrast to SphK1, for which a wide number of inhibitors have been developed, very few potent inhibitors of SphK2 have been described and most of them only displayed moderate activity against SphK2. Moreover, the vast majority of them are not SphK2 specific, thus further complicating the interpretation of their *in vitro* and *in vivo* effects. The most well-known isotype specific inhibitors of SphK2 are: ABC294640,[21] (*R*)-FTY720-OMe,[22] K145,[23] and SLM6031434[24] one of the most potent reported up to now.

We have recently described two types of structural scaffolds for developing new SphK1 inhibitors.[25] These new compounds were obtained through virtual screening, being the most active compounds of these series (molecules **2–4** (Table 1)). Considering there are relatively few inhibitors of SphK2 reported, we were interested in determining whether some of the compounds in our screen with moderate or no activity against SphK1 would inhibit SphK2. Thus, in the current study we report the inhibitory activity on SphK2 and a molecular modeling approach that allowed us to design, synthesize, and evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of a new SphK2 inhibitor. Furthermore, we have also examined the potential anti-inflammatory effect of the most active compounds in this series.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

2.1 | Evaluating SphK2 inhibitory activity

We first evaluated the SphK2-inhibitory activity of the 16 compounds selected from our previous screen of SphK1 inhibitors.[25] Synthesis and structural characterization of compounds **1–16** has been described[25,26] and their structures are shown in Table 1. SphK2 inhibitors were evaluated in a 384-well high-throughput format assay as described.[27] Of these compounds, only three showed significant SphK2 inhibitory activity: compounds **2**, **4**, and **13** (IC_{50} values lower than 200 μM) (Figure 1a).

Compound **2**, which had the highest inhibitory effect on SphK1 (IC_{50}, 12 μM), also showed the strongest inhibitory activity against SphK2 (IC_{50}, 27.8 μM). In turn compounds **4** and **13** displayed 56.8 and 140 μM inhibitory activity, respectively.

It is important to note that we have previously reported that K145 suppressed SphK2 activity with an IC_{50} of 33.7 μM,[27] which is comparable with the IC_{50} value determined with the conventional radioactive assay.[23] Thus, it is possible to consider that the inhibitory effects found for compound **2** are comparable to that reported for K145 and therefore very significant. However, to search for a new SphK2 inhibitor with a novel structural scaffold highly selective for SphK2, we next carried out a molecular modeling study using starting structures based on compounds **2**, **4**, and **13**.

The assay used for screening SphK compounds has been extensively characterized and demonstrated to reliably reproduce IC_{50}s for well-known SphK inhibitors.[27] However, in screening assays we used 50 μM K145 positive control for SphK2 inhibition. As shown in Supporting Information Figure S1, no SphK2 activity was observed under these conditions.

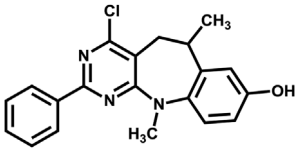
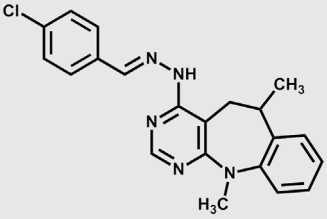
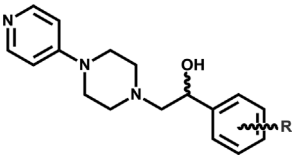
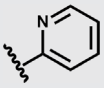
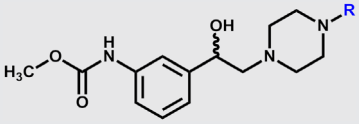
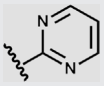
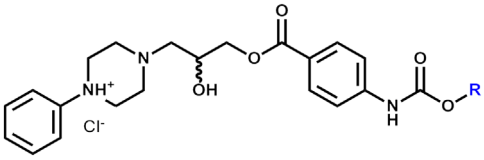
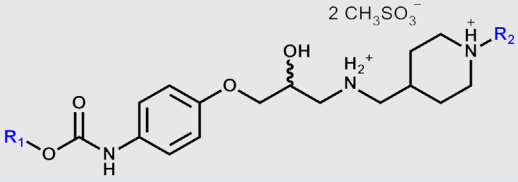
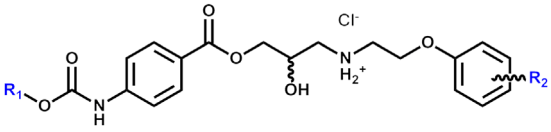
2.2 | Molecular modeling

We conducted a molecular simulation study to identify the critical molecular interactions between compounds **2**, **4**, and **13** with active site residues of SphK2. Since no crystal structure is currently available for SphK2, we generated a structural model of SphK2 using MODELLER,[28] a comparative protein structure modeling program, using the structure of SphK1 (*Homo sapiens*) (PDB ID: 3VZB, 3VZC, 3VZD, 4L02, 4V24) as a template.[15,29,30]

The main objective of this study was to assess the interactions that stabilize or destabilize receptor-ligand (R-L) complexes. As a reference, we also included the SphK2-isotype specific compounds K145[23] and SLM6031434[24] that are strong and selective SphK2 inhibitors. It was expected that this approach would produce a comparative analysis of different SphK2 inhibitory activities of these molecules in relation to their structural differences (Figure 2).

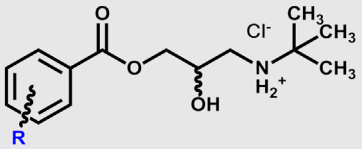
The molecular modeling study was conducted in three different stages. First, a docking analysis was carried out using the AutoDock program.[31] In the second stage, molecular dynamics (MD) simulations were made using the AMBER software package.[32] From the

TABLE 1 Structural features of compounds selected to evaluate SphK inhibitory effect[25]

Compounds	Structure	IC_{50} (μM)	
		SphK1	SphK2
1		>650	>650
2		12	28
3 = −*m*-NHCOO$(CH_2)_3CH_3$		60	>650
4 = −*p*-NHCOO$(CH_2)_3CH_3$		55	57
5 = 		>650	>650
6 = 		>650	>650
7 = $-CH_3$		>650	>650
8 = $-CH_2CH_3$		>650	>650
9 = $-(CH_2)_3CH_3$		>650	>650
10 = R_1=$-CH_3$ R_2=$-(CH_2)_3CH_3$		>650	>650
11 = R_1=$-(CH_2)_3CH_3$ R_2=$-(CH_2)_3CH_3$		>650	>650
12 = R_1=$-CH_3$ R_2=$-(CH_2)_2CH_3$		>650	>650
13 = R_1=$-(CH)_2CH_3$ R_2=$-$p$-OCH_3$		>650	140
14 = R_1=$-(CH_2)_2OCH_3$ R_2=−(2,6-dimethoxy)		>650	>650

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Compounds	Structure	IC_{50} (μM) SphK1	IC_{50} (μM) SphK2
15 = −o-$O(CH_2)_2OCH_3$		>650	>650
16 = −p-$O(CH_2)_3CH_3$		>650	>650

trajectories obtained with the MD simulations, a *per*-residue analysis was performed for each compound.

The docking analysis indicated that all compounds fit in the binding pocket of SphK2 (Figure 3). Furthermore, the docking analysis and MD simulations suggested that these compounds bind in a very comparable manner and interact with similar amino acids. Per-residue analysis helped to define the main interactions that stabilize the different complexes (Figure 4). In general, the new SphK2 inhibitors described here displayed the pharmacophoric portion at the active site in a similar manner to K145.[23]

It should be noted that SLM6031434 is more active and selective on SphK2, however, our docking studies and MD simulations indicate that this compound does not bind in a similar way to K145 nor to our compounds (Supporting Information Figure S2). Thus, for the molecular modeling studies, K145 was taken as the reference compound.

MD simulations indicate that residues participating in the stabilization of inhibitors–enzyme interactions are: Phe339, Val340, Phe358, Leu540, Leu542, Leu549, Cys569, Phe584, Met587, His592, and Leu600. Similar histograms were obtained for compounds **2**, **4** (Figure 4c and d), and **13** (Supporting Information Figure S3). It should be noted that MD simulations predicted conservation between amino acids stabilizing compounds **2**, **4**, and **13** with SphK2. Therefore, it can be concluded that these compounds bind in a similar manner to K145 as they essentially interact with the same SphK2 residues. Based on these results, we sought to obtain compounds that were structurally related to compounds **2**, **4**, and **13**, and had closely matching simulated SphK2 binding histograms.

Furthermore, it is interesting to note that compound **3** is selective for SphK1 with an IC_{50} of 60 μM, while compound **4** has an IC_{50} of 55 and 56.8 μM for SphK1 and SphK2, respectively (see Table 1). Although these compounds are isomers, our docking study shows that they are located very differently in the active site of the protein (Supporting Information Figure S4). This could give us an indication about why one is selective while the other is not.

The docking was done using the AutoDock program, using a box centered on the active site, with a size of 30 × 64 × 24 Å. Two hundred conformations were obtained, of which the lowest energy was graphed for each case.

2.3 | Design of novel SphK2 inhibitors

Several synthesizable compounds with modifications on the basic structures of compounds **2** and **13** structures were simulated in the docking analysis and MD computations. Two aspects were considered for the selection of the candidate compounds. On one hand, a

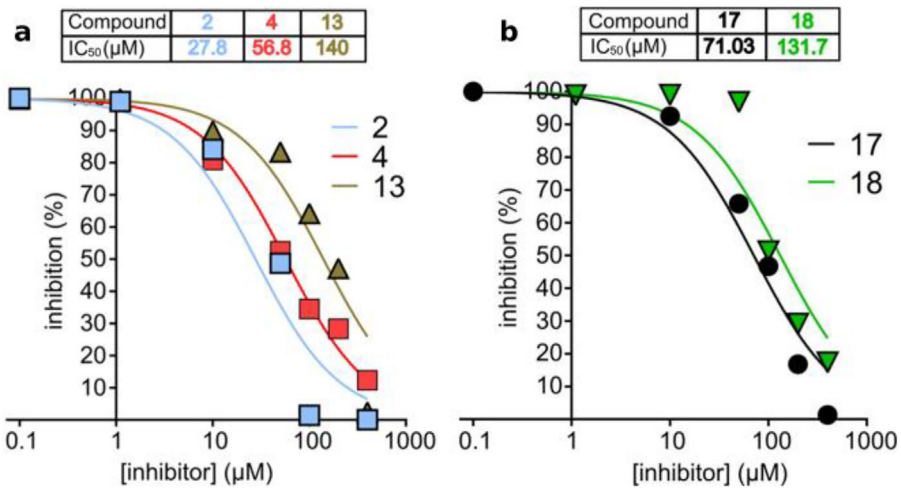


FIGURE 1 SphK2 percent inhibition versus concentration plot for the compounds **2**, **4**, **13** (a), **17** and **18** (b)

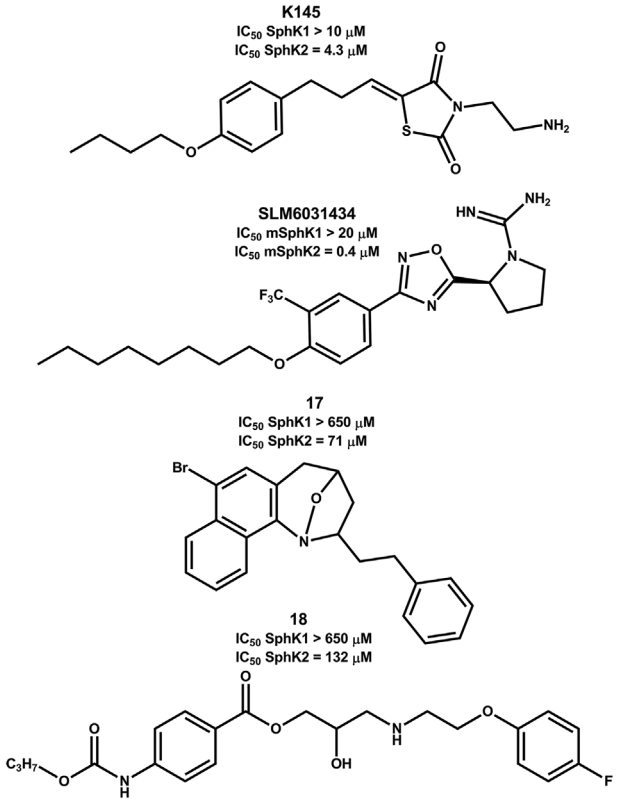


FIGURE 2 Structural features of K145, SLM6031434 and compounds **17** and **18**. mSphK1 and mSphK2 correspond to mouse sphingosine kinase 1 and 2, respectively. All other determinations were performed on human cells

limitation was that the proposed compound was available in our laboratory or that it could be synthesized without major problems for us. The other condition was that it had a certain structural similarity (at least considering its central scaffolding) with compounds **2**, **4**, and **13**.

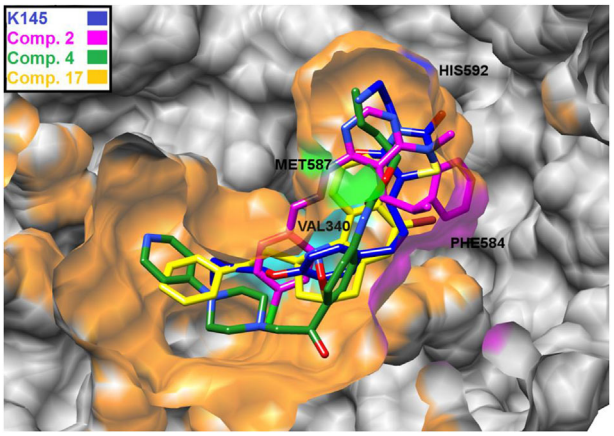


FIGURE 3 Spatial view of the overlap of the following compounds: K145 (blue), **2** (magenta), **4** (green), and **17** (yellow). These compounds are interacting in the active site of SphK2. The main amino acids involved in the formation of the complexes are also shown in this figure. The structures were taken from a clustering process in which the last 40 ns of each of the three simulations were considered

Of 12 potential SphK2 inhibitors (structures shown in Supporting Information Table S1), only 7-bromo-2-(2-phenylethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-epoxynaphtho[1,2-*b*]azepine (**17**) and *N*-[2-(4-fluorophenoxy)ethyl]-2-hydroxy-3-({4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoyl)-oxy)-propan-1-aminium chloride (**18**) (Figure 2) behaved similarly in our simulations as known SphK 2 inhibitors. As shown in Figures 5 and 3 (for compound **17**), SphK2-active binding site was very similar to those obtained for compounds **2**, **4** (Figure 4c and d), and **13** (Supporting Information Figure S3), as they were to the simulations with the reference compound, K145 (Figure 4a).

2.4 | Synthesis and inhibition studies for compounds 17 and 18

Compounds **17** and **18** were synthesized and evaluated for their inhibitory activity against SphK2. Compound **17** was synthesized as previously reported,[33] and involved the selective oxidation of the corresponding 2-allyl-4-bromo-*N*-(3-phenylpropyl)naphthalen-1-amine with an excess of hydrogen peroxide solution in the presence of catalytic amount of sodium tungstate. The subsequent internal 1,3-dipolar cycloaddition of the resulting nitrone toward the terminal C═C bond of the pendant allylic fragment connected to the *ortho* position gave the tricyclic 1,4-epoxycycloadduct **17** (Scheme 1). In these conditions, the thermal induced intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition of the intermediate nitrone was entirely stereoselective leading to the exclusive formation of the 2-*exo*-cycloadduct, as demonstrated by ^{1}H NMR spectroscopy. The stereochemistry was deduced from chemical shift and coupling constant values of protons at the 1,4-epoxytetrahydroazepine ring protons (see Section 4), and especially because of the absence of correlation between tertiary 2-H and 4-H protons in the NOESY spectrum. Compound **17** was obtained as a racemic mixture of (2*R*,4*S*) and (2*S*,4*R*) forms.

N-[2-(4-Fluorophenoxy)ethyl]-2-hydroxy-3-({4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoyl}oxy)propan-1-aminium chloride (**18**) was synthesized by the multiple-step reactions shown in Scheme 2 and described by Tengler et al.[34] Briefly, oxiran-2-ylmethyl-4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoate was prepared from 4-aminobenzoic acid by reaction with propyl chloroformiate that yielded 4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoic acid that was converted to propyl [4-(chlorocarbonyl)phenyl]carbamate by reaction with thionyl chloride. The desired epoxide was formed after reaction of propyl [4-(chlorocarbonyl)phenyl]carbamate with 2,3-epoxypropan-1-ol. The oxirane ring was opened by addition of 2-(4-fluorophenoxy)ethanamine prepared by Gabriel synthesis from 4-fluorophenol via 1-(2-bromoethoxy)-4-fluorobenzene and 1-(2-bromoethoxy)-4-fluorobenzene. The product, 3-{[2-(4-fluorophenoxy)ethyl]amino}-2-hydroxypropyl 4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoate, was transformed to the hydrochloride salts with higher water solubility using ethereal HCl.

SphK2 inhibition assays were performed as previously described[27] with **17** and **18**. Compound **17** showed a higher SphK2 inhibitory capacity (71.0 μM), while compound **18** expressed only moderate activity (131.7 μM), see Figure 1b. Interestingly, compound

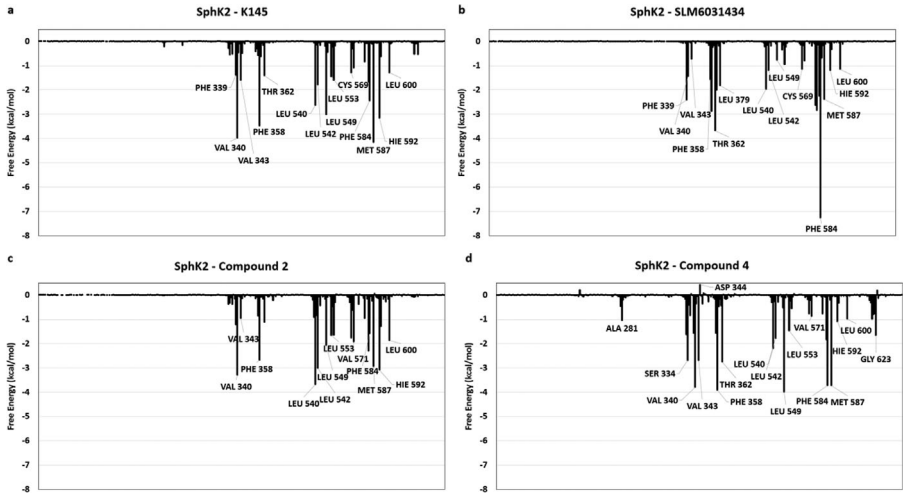


FIGURE 4 Histograms show the interaction energies obtained for the specific inhibitors K145 (a), SLM6031434 (b) and compounds **2** (c) and **4** (d) with the main amino acids involved in the complex formation

17 inhibits SphK2 but had no inhibitory effect on SphK1 (data shown in Table 1).

As it has been suggested that development of SphK1/SphK2 selective inhibitors might be useful for treatment of inflammatory and/or autoimmune diseases,[12,35] it was of interest to evaluate the potential anti-inflammatory effect of **17**. To establish proper comparisons, compounds **2**–**4** and **17** were tested. In regard to this, compound **2** was the most potent in the series, but non-isotype-selective (IC_{50} SphK1 = 12 μM and IC_{50} SphK2 = 28 μM); compound **4** inhibited both enzymes but weaker than **2** (IC_{50} SphK1 = 55 μM and IC_{50} SphK2 = 56 μM); compound **3** was selective for SphK1 (IC_{50} SphK1 = 60 μM) and compound **17** selectively inhibited SphK2 (IC_{50} SphK2 = 71 μM). Interestingly compound **17** does not show any inhibitory effect against SphK1 even at high concentration (650 μM).

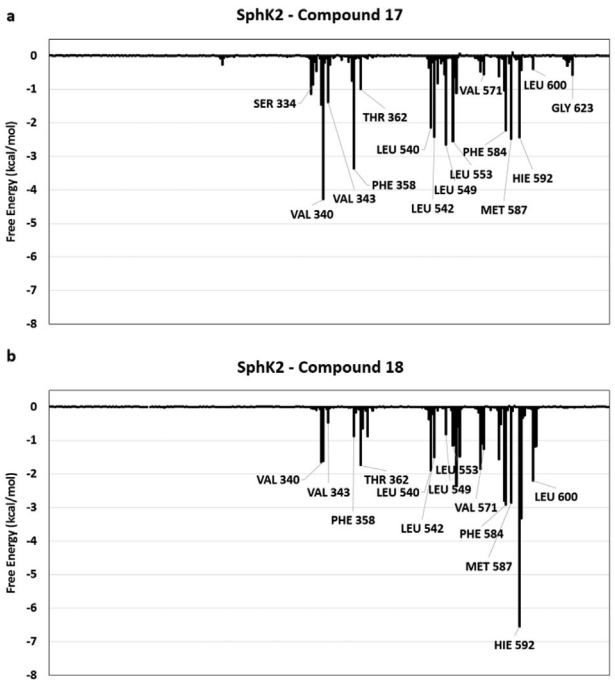


FIGURE 5 Histograms show the interaction energies obtained for **17** (a) and **18** (b) with the main amino acids involved in the complex formation

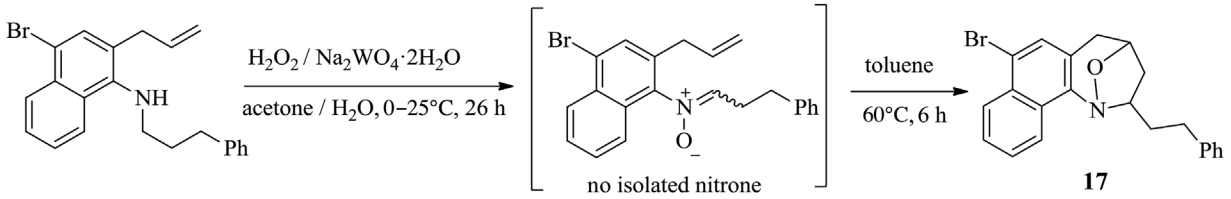
2.5 | Cell viability assay

The cytotoxicity effects of these compounds on cell viability were determined by MTT assay. Compound **2**, with a benzo[*b*]pyrimido[5,4-*f*]azepine system, showed high cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human neutrophils, decreasing cell viability by more than 40% at 10 μM (Figure 6a and b).

Compound **3** with a pyridinyl-piperazine phenyl 3-carbamate structure, displayed cytotoxicity in HUVEC at 30 μM and was cytotoxic for neutrophils at all concentrations assayed (10–100 μM) (Figure 6c and d). In contrast, compound **4**, an isomer of **3**, showed no toxicity at 100 μM in HUVEC when it was compared with vehicle (0.04% DMSO in medium). Compound **17** with an epoxynaphtho[1,2-*b*]azepine system, only showed significant toxicity at the maximum dose of 100 μM in human neutrophils but cell viability remained higher than 70% (Figure 6e–h).

2.6 | Compound 17 reduces the adhesion of leukocytes to dysfunctional endothelium

Inflammation and especially the adhesion of mononuclear cell to the dysfunctional endothelium play an important role in atherosclerosis development.[36] One of the key events in the inflammatory process involves endothelial-leukocyte adhesion and their subsequent emigration to the extravascular space.[37] To examine the effect of SphK2 inhibition with the less toxic compounds **4** and **17** on leukocyte adhesion, parallel-plate flow chamber assays were carried out. This experimental setting allows studies of leukocyte–endothelial cell



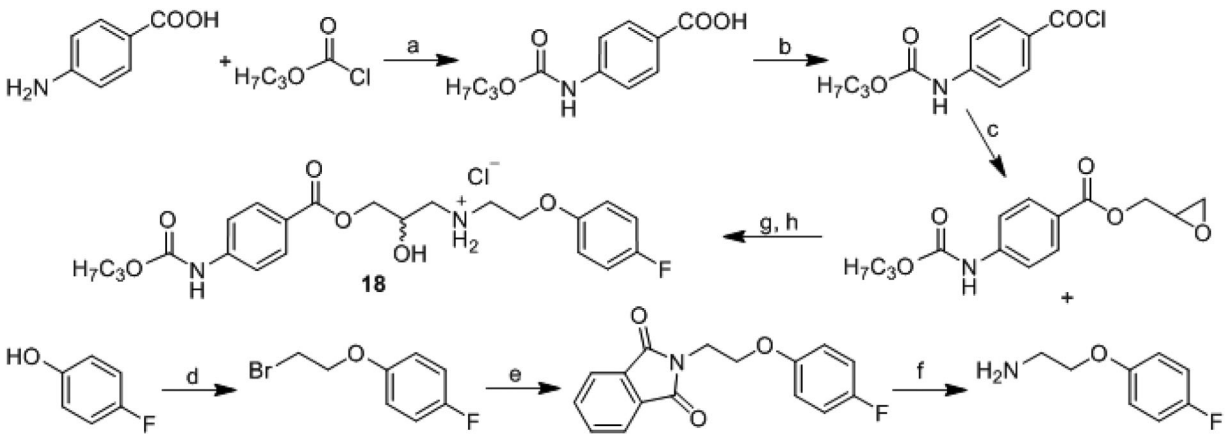
SCHEME 1 Synthesis of (2*RS*,4*SR*)-7-bromo-2-(2-phenylethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-epoxynaphtho[1,2-*b*]azepine (**17**)

interactions under flow conditions mimicking the *in vivo* physiological fluid dynamics within the blood vessels of the microcirculation. When neutrophils were perfused across TNFα-stimulated endothelial cells, significant leukocyte adhesion was observed compared to the adhesion to unstimulated endothelial cells (0.04% DMSO, Figure 7a). Preincubation with compound **4**, the pyridinyl-piperazine phenyl 4-carbamate, prior to TNFα stimulation, did not affect TNFα-induced neutrophil adhesion to endothelial cells at the concentration assayed (100 μM, Figure 7a). When endothelial cells were incubated with compound **17**, the epoxynaphtho[1,2-*b*]azepine, although some inhibition of neutrophil arrest to the dysfunctional endothelium (TNFα stimulated) was detected, the reduction in this parameter was below 50% (43.4%) at 100 μM (Figure 7a).

Compounds **4** and **17** were firstly assayed at 100 μM to evaluate their impact on mononuclear cell adhesion. At this concentration, while compound **4** did not significantly affect TNFα-induced mononuclear cell-endothelial adhesion, compound **17** did (Figure 7b). Since this effect was inhibited by 70%, at 100 μM, the effect of compound **17** was analyzed within a concentration range of 0.1–100 μM. Interestingly, compound **17** inhibited in a concentration-dependent manner mononuclear leukocyte-endothelial cell adhesion elicited by TNFα (Figure 7c) with an estimated IC_{50} of 3 μM. These results are relevant given that the effect on mononuclear cell recruitment exerted by compound **17** differs from those displayed on neutrophils suggesting that it likely does not compromise neutrophilic responses which are necessary for innate host defence.

In order to explore the mechanisms involved in the decreased mononuclear cell adhesion to endothelial cells provoked by compound **17**, we next investigated its effect on endothelial cell adhesion molecule (CAM) expression and fractalkine (CX_3CL1) up-regulation. TNFα caused increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, Figure 8a), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, Figure 8b), and the membrane-bound chemokine fractalkine (CX_3CL1, Figure 8c). It is interesting to point out that both VCAM-1 and fractalkine (CX_3CL1) are mainly expressed in the vasculature at sites prone to atherosclerosis lesion formation and here we show that preincubation of endothelial cells with compound **17** at 10 μM, significantly reduced TNFα-induced ICAM-1 (a), VCAM-1 (b), and fractalkine (CX_3CL1) (c) expression by 60.0, 60.2, and 59.1%, respectively (Figure 8).

In conclusion, our results indicate that compound **17** which is a SphK2 selective inhibitor, shows no (endothelial cells) or low toxicity (neutrophils) toward human cells and is able to inhibit mononuclear cell adhesion to the dysfunctional endothelium with a minimal impact on neutrophil responses. These responses are in part mediated through down-regulation of endothelial cell adhesion molecule and fractalkine expression (CX_3CL1). Therefore, compound **17** is a potential candidate to be used in the treatment of inflammatory disorders in which mononuclear cell recruitment plays a prominent role such as cardiovascular diseases associated to cardiometabolic disorders.



SCHEME 2 Synthesis of *N*-[2-(4-fluorophenoxy)ethyl]-2-hydroxy-3-({4-[(propoxycarbonyl)amino]benzoyl}oxy)propan-1-aminium chloride (**18**).[34] *Reagents and conditions:* a) acetone, pyridine; b) $SOCl_2$, toluene; c) 2,3-epoxypropan-1-ol, THF, TEA; d) 1,2-dibromoethane, NaOH; e) potassium phthalimide, KI, DMF; f) $NH_2NH_2.H_2O$, ethanol; g) propan-2-ol; h) HCl, Et_2O

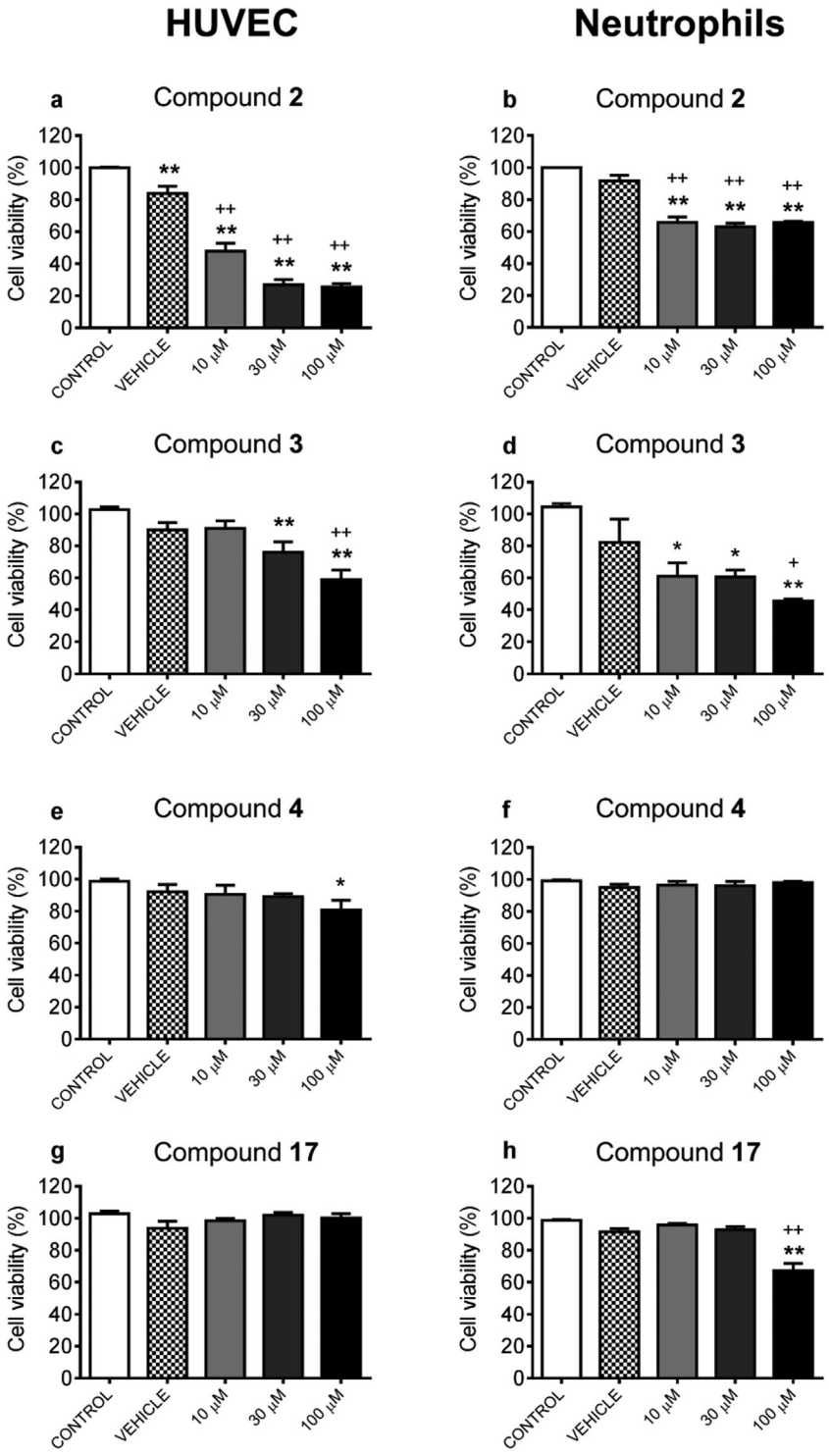


FIGURE 6 HUVEC and human neutrophil viability after 24 h incubation with four sphingosine kinase inhibitors. Cells were incubated with compounds **2**–**4** and **17** at 10, 30, and 100 µM, just with medium (control) or medium plus vehicle (vehicle, 0.04% DMSO in medium) for 24 h and MTT assay was performed. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of viable cells in $n = 5$ independent experiments. $^{*}p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$ versus control, $^{+}p < 0.05$ or $^{++}p < 0.01$ versus vehicle

3 | CONCLUSIONS

In this work, we used a molecular modeling approach that allowed us to obtain new inhibitors of SphK2 with novel structural scaffolds. Particularly interesting is that compound **17** which is a selective inhibitor of SphK2 and does not have exert any cytotoxic effects, has a potent anti-inflammatory effect since it inhibits mononuclear cell adhesion to the dysfunctional endothelium.

It should be noted that compound **17** shows an anti-inflammatory activity in a concentration-dependent manner with an IC_{50} in the low micromolar range. Therefore, based on our results we cannot say that the anti-inflammatory activity of this compound is due only to the action on this enzyme. In fact, it is logical to have doubts about the mechanisms responsible to produce the anti-inflammatory effect of these compounds. However, it is reasonable to think that its biological activity is due, at least in part, to the aforementioned inhibitory effect. On the other hand, its profile makes itself an interesting starting structure for the search for new selective inhibitors of SphK2, as well as new anti-inflammatory agents.

It is important to note that 7-bromo-2-(2-phenylethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-epoxynaphtho[1,2-*b*]azepine (**17**) was obtained from a molecular modeling study carried out based on the structure of 4-[(2*E*)-2-(4-chlorobenzylidene)hydrazinyl]-6,11-dimethyl-6,11-dihydro-5*H*-pyrimido[4,5-*b*][1]benzazepine (**2**) and using K145 as control structure. Therefore, the information obtained from this theoretical model based on the molecular interactions involved in the stabilization of the different complexes can be useful in the search for new inhibitors of SphK2 recruitment, which plays a prominent role, such in inflammatory and cardiovascular diseases.

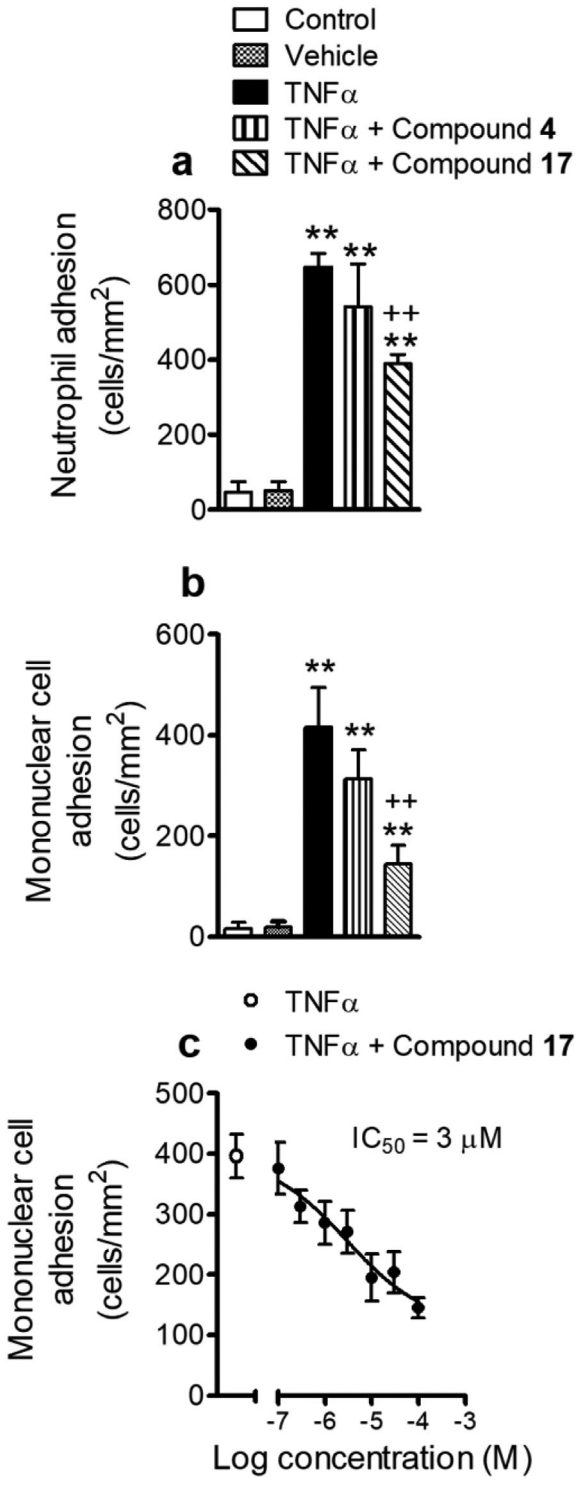


FIGURE 7 Continued.

4 | EXPERIMENTAL

4.1 | Chemistry

4.1.1 | General

Commercially available compounds were used as received, unless stated otherwise. Melting points were measured by a Barstead electrothermal 9100 apparatus or a Kofler hot plate apparatus HMK (Franz Kustner Nacht GK, Dresden, Germany) and are uncorrected. TLC was performed on silica gel 60 F_{254} on aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany) and visualized with UV light (254 nm). Compounds were purified by silica gel 60 (40–63 μm, Merck 9385) column

FIGURE 7 (a) Compound **17** but not **4** modestly inhibits neutrophil adhesion to the dysfunctional endothelium (TNFα-stimulated). Cells were pretreated for 24 h with compound **4**, **17** (100 μM), just with medium (control) or medium plus vehicle (vehicle, 0.04% DMSO) prior to TNFα stimulation (20 ng/mL, 24 h). Freshly isolated human neutrophils were perfused across the endothelial monolayers for 5 min at 0.5 dynes/cm^2 and neutrophil adhesion was quantified. (b and c) Compound **17** inhibits mononuclear cell adhesion to the dysfunctional endothelium (TNFα-stimulated) in a concentration-dependent manner. (b) Cells were pretreated for 24 h with compound **4**, **17** (100 μM), just with medium (control) or medium plus vehicle (vehicle, 0.04% DMSO) prior to TNFα stimulation (20 ng/mL, 24 h). Freshly isolated human mononuclear cells were perfused across the endothelial monolayers for 5 min at 0.5 dynes/cm^2 and mononuclear cells adhesion was quantified. (c) Cells were pretreated for 24 h with compound **17** (0.1–100 μM), just with medium (control) or medium plus vehicle (vehicle, 0.04% DMSO) prior to TNFα stimulation (20 ng/mL, 24 h). Freshly isolated human mononuclear cells were perfused across the endothelial monolayers for 5 min at 0.5 dynes/cm^2 and mononuclear cell adhesion was quantified. Results are the mean ± SEM of 4–6 independent experiments. $^{**}p < 0.01$ versus vehicle, $^{++}p < 0.01$ versus TNFα-stimulated cells

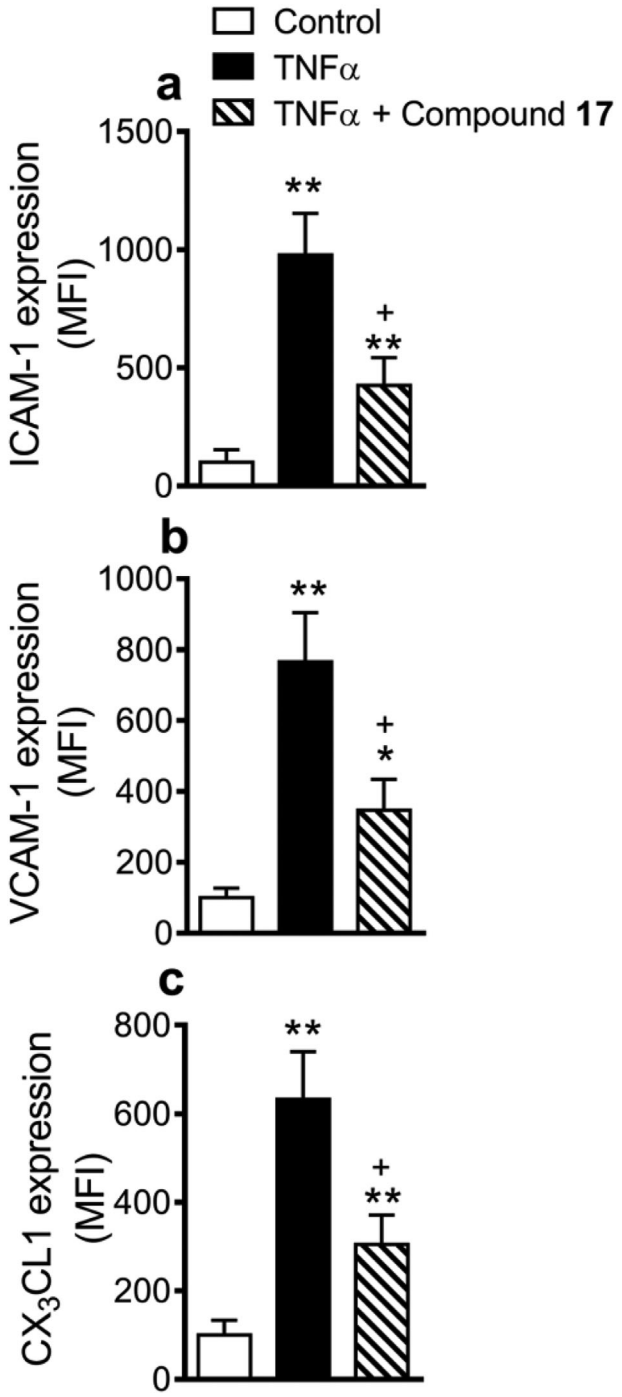


FIGURE 8 Compound **17** inhibits TNFα-induced ICAM-1, VCAM-1, and CX_3CL1 expression on HUVEC. Some cells were pretreated with compound **17** (10 μM) 24 h before TNFα stimulation (20 ng/mL, 24 h) or with vehicle (0.04% DMSO in medium). ICAM-1 (a), VCAM-1 (b), and CX_3CL1 (c) expression was determined by flow cytometry. Results (mean ± SEM) are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of $n = 6$ independent experiments. $^{*}p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$ relative to the vehicle group, $^{+}p < 0.05$ or $^{++}p < 0.01$ relative to TNFα-stimulated cells

chromatography. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded at 25°C with $CDCl_3$, CD_3OD or DMSO-d_6 as solvents on Bruker AC-300, AC-400, AC-500 or Avance III 400 MHz FT-NMR spectrometers (Bruker, Karlsruhe, Germany). The carbon typology (C, CH, CH_2 or CH_3) was deduced from ^{13}C NMR DEPT experiments, which along with the 2D experiments, COSY, HSQC, and HMBC correlations, permitted the full assignation of all carbons and hydrogens. Chemical shifts are relative to the solvent peaks used as reference and reported in δ parts per million (ppm), and J values in Hz. High-resolution mass spectra (HRMS) were measured using a high-performance liquid chromatograph Dionex UltiMate® 3000 (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA) coupled with a LTQ Orbitrap XL™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Fourier transform mass spectrometer (Thermo Scientific) with injection into HESI II in the positive or negative mode, or on a Waters Micromass AutoSpect NT (equipped with a direct inlet probe) by electronic impact operating at 70 eV. IR spectra were recorded on a Bruker Tensor 27 spectrometer (equipped with a platinum ATR cell).

The InChI codes of the investigated compounds together with some biological activity data are provided as Supporting Information.

4.1.2 | Synthesis of (2*RS*,4*SR*)-7-bromo-2-phenethyl-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-epoxy-naphtho[1,2-*b*]azepine (17)

Sodium tungstate dihydrate $Na_2WO_4.2H_2O$ (0.072 g, 0.22 mol), followed by 30% aqueous hydrogen peroxide solution (0.74 mL, 6.72 mmol), were added to a stirred and cooled solution of the 2-allyl-4-bromo-*N*-(3-phenylpropyl)naphthalen-1-amine (0.85 g, 2.24 mmol) in acetone–water (30 mL, 10:3 v/v). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 26 h, after that was filtered and the solvent removed under reduced pressure. Toluene (30 mL) was added to the organic residue and the resulting solution was heated at 60°C for 6 h. After cooling the solution to ambient temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica using heptane–ethyl acetate (compositions ranged from 30:1 to 10:1 v/v) as eluent to afford **17** as a pale-yellow syrup in yield 43%. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.39 (dd, J = 7.0, 2.2 Hz, 1H, CH-11), 8.17 (dd, J = 7.0, 2.1 Hz, 1H, CH-8), 7.59 (td, J = 7.0, 2.2 Hz, 1H, CH-10), 7.54 (td, J = 7.0, 2.1 Hz, 1H, CH-9), 7.50 (s, 1H, CH-6), 7.29 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 2H, CH-2″ and CH-6″), 7.28 (t, J = 8.3 Hz, 2H, CH-3″ and CH-5″), 7.18 (td, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H, CH-4″), 4.94 (ddd, J = 8.0, 5.5, 2.8 Hz, 1H, CH-4), 3.48 (dd, J = 16.9, 5.5 Hz, 1H, CH_B-5), 3.17 (dddd, J = 11.0, 8.5, 5.5, 3.0 Hz, 1H, CH-2), 3.13 (ddd, J = 13.9, 11.0, 5.5 Hz, 1H, CH_A-2′), 2.84 (ddd, J = 13.9, 11.0, 5.5 Hz, 1H, CH_B-2′), 2.52 (d, J = 16.9 Hz, 1H, CH_A-5), 2.28 (dddd, J = 13.6, 11.0, 6.0, 5.5 Hz, 1H, CH_A-1′), 2.16–2.22 (m, 2H, CH_AH_B-3), 1.81 (ddt, J = 13.6, 11.0, 5.5 Hz, 1H, CH_B-1′). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 145.4 (C-11b), 141.8 (C-1″), 131.2 (C-6), 130.9 (C-7a), 128.8 (C-11a), 128.6 (C-2″ and C-6″), 128.5 (C-3″ and C-5″), 127.3 (C-8), 127.1 (C-10), 126.9 (C-9), 126.0 (C-4″), 122.4 (C-11), 122.3 (C-5a), 119.6 (C-7), 74.6 (C-4), 72.3 (C-2), 39.9 (C-3), 38.7 (C-1′), 35.2 (C-5), 33.7 (C-2′). HRMS (EI, 70 eV): $C_{22}H_{20}NOBr$ calcd. 393.0728 *m/z*. Found: 393.0722 *m/z*. IR (ATR, cm^{-1}): ν_{max} = 1497 (C=C), 1258 (C-N), 1043 (C-O), 990 (N-O).

4.1.3 | Synthesis of compound 18

The detailed synthetic pathway and full analytical characterization of the discussed compound **18** as well as intermediates are provided in Tengler et al.[34]

4.2 | SphK2 inhibition assays

Potential SphK2 inhibitors were evaluated with fluorescence SphK2 assays in 384-well format as described.[27] Briefly, compounds were dissolved in DMSO and initially screened at 650 μM. Candidates showing inhibition at this concentration were further characterized to obtain IC_{50}s. SphK2 activity was measured in 384-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) in buffer containing 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05% Triton X-100, 200 mM KCl, and 10% glycerol, in the presence of NBD-sphingosine (60 μM; Avanti Polar Lipids), and recombinant SphK2 (15 nM). Reactions were initiated with the addition of an ATP–Mg mixture (1 mM ATP, 2 mM $MgCl_2$, 40 mM Tris-HCl pH 7.4), and followed in a TECAN Infinite M1000 fluorescence plate reader (Männedorf, Switzerland) at 37°C. Excitation and emission wavelengths were 550 and 584 nm, respectively. All data were analyzed using GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA)

4.3 | Toxicological studies and study of potential anti-inflammatory activity

4.3.1 | Human studies

All research with human samples in the current study complied with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Ethics Committee of the University Clinic Hospital of Valencia (Valencia, Spain). Written, informed consent was obtained from all volunteers.

4.3.2 | Reagents and compounds

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and dimethyl sulfoxide (DMSO) and tumor necrosis factor-alpha (TNFα) were purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). All tested compounds **2–4** and **17** were dissolved in culture medium containing DMSO (0.04%).

4.3.3 | Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated by collagenase treatment[38] and maintained in human specific endothelial basal medium (EBM-2, Lonza, Verviers, Belgium), supplemented with endothelial growth media (EGM-2, Lonza, Verviers, Belgium) and 10% of fetal bovine serum (FBS, Lonza, Verviers, Belgium). Cells up to passage 1 were grown to confluence to preserve endothelial features. Prior to every experiment, cells were incubated 16 h in medium containing 1% FBS.

4.3.4 | MTT assay

Cytotoxicity studies were performed with both HUVECs and freshly isolated human neutrophils using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay.[39] Neutrophils were obtained from buffy coats of healthy donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation as described.[40] A total of 100 μL of neutrophils and HUVEC suspension in supplemented RPMI medium (2×10^5 cells/mL (Biowest, Nuaillé, France) were added to each well of a 96-well microtiter plate. Cells were incubated in the absence or presence of compounds at 37°C for 24 h. Compounds **2–4** and **17** were tested at three different concentrations: 10, 30, and 100 μM. Some assays were carried out just with medium and others with vehicle (0.04% DMSO in medium). MTT was freshly prepared at 2 mg/mL in PBS. A total of 100 μL of MTT solution was added to each well and incubated at 37°C for another 3 h. The supernatants were discarded and 200 μL of DMSO were added to each well to dissolve the formazan. The optical densities at dual wavelengths (560 and 630 nm) were determined in a spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Results were presented as mean ± standard errors of mean (SEM).

4.3.5 | Leukocyte–endothelial cell interactions under flow conditions

HUVECs up to passage 1 were grown to confluence and stimulated with recombinant human TNFα (20 ng/mL) for 24 h. Cells were pre-incubated for 24 h with compounds **4** or **17** at 100 μM. Some assays were carried out just with medium or with vehicle (0.04% DMSO in medium). Then, cells were stimulated with TNFα (20 ng/mL) for another 24 h. In another set of experiments, cells were pretreated or not with compound **17** (0.1–100 μM) for 24 h prior to TNFα stimulation (20 ng/mL, 24 h). Human neutrophils and mononuclear cells were obtained from buffy coats of healthy donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation.[40] The Glycotech flow chamber (GlycoTech, Gaithersburg, MD) was assembled and placed on an inverted microscope stage. Freshly isolated neutrophils or mononuclear cells (1×10^6 cells/mL) were then perfused across the endothelial monolayers (HUVEC) unstimulated or stimulated with 20 ng/mL of TNFα for 24 h. Leukocyte interactions were determined after 5 min at 0.5 dyn/cm^2. Cells interacting on the surface of the endothelium were visualized and recorded (×20 objective, ×10 eyepiece) using phase-contrast microscope (Axio Observer A1 Carl Zeiss microscope, Thornwood, NY).

4.3.6 | Determination of cell adhesion molecule and fractalkine (CX_3CL1) expression by flow cytometry

HUVEC expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and fractalkine (CX_3CL1) were determined by flow cytometry. Cells were pretreated for 24 h with compound **17** (10 μM) or vehicle (0.04% DMSO in medium) and stimulated for additional 24 h with TNFα (20 ng/mL). Then, endothelial

cells were detached from culture flasks by scraping in ice-cold PBS containing 2 mM EDTA. Next, cells were washed and incubated at 2×10^6 cells/mL for 1 h at 4°C in the dark with FITC-conjugated mAb against human ICAM-1 (diluted 1:25; 400 µg/mL; clone HA58, BioLegend, San Diego, CA), an APC-conjugated mAb against human VCAM-1 (diluted 1:30; 100 µg/mL; clone STA, BioLegend, San Diego, CA) or with a PE–conjugated mAb against human CX_3CL1 (diluted 1:25; 1.25 µg/mL; clone 51637, R&D Systems, Minneapolis, MN), all diluted in PBS with 3% BSA. Samples were run in a flow cytometer (FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, CA). The expression of ICAM-1 (FITC-fluorescence), VCAM-1 (APC-fluorescence) and CX_3CL1 (PE-fluorescence) was expressed as the mean of fluorescence intensity (MFI).

4.4 | Molecular modeling

4.4.1 | Homology modeling

Since no crystal structure is currently available for SphK2, we generated a structural model of SphK2 using MODELLER,[28] using the structure of sphingosine kinase 1 (*Homo sapiens*) (PDB ID: 3VZB, 3VZC, 3VZD, 4L02, 4V24) as a template.[15,29,30] A high degree overall homology to the template (52% in aligned regions) was found and there is a considerable sequence and structural similarity at the sphingosine binding (C4) domain.

Human SphK2 (code: Q9NRA0) sequence was obtained from the UNIPROT database (www.uniprot.org/). A position specific iterated BLAST[41,42] search against the database of Protein Data Bank proteins identified a kinase – sphingosine kinase 1 from *Homo sapiens* (PDB ID: 4V24), as the closest match to both proteins with 52.12% identity and 44% homology in the aligned regions of SphK. Unaligned regions in the protein were deleted. The model for the protein with the lowest DOPE (discrete optimized protein energy) scores was chosen for further refinement.

We refined the geometry by performing molecular dynamics simulations. The modeled protein was soaked in truncated octahedral periodic boxes of explicit water using the TIP3P model and subjected to MD simulation. All MD simulations were performed with the Amber software package. Sodium ions were added to neutralize the charge of the system. The entire system was subjected to energy minimization.

In the next place each system was then heated in the NVT ensemble from 0 to 300 K in 500 ps and equilibrated at an isothermal isobaric (NPT) ensemble for another 2 ns. A Langevin thermostat was used for temperature coupling with a collision frequency of 1.0 ps^{-1}. The particle mesh Ewald (PME) method was employed to treat the long-range electrostatic interactions in a periodic boundary condition. The SHAKE method was used to constrain hydrogen atoms. The time step for all MD is 2 fs, with a direct-space, non-bonded cutoff of 8 Å. Finally, three MD simulations of 50 ns were conducted under different starting velocity distribution functions; thus, in total 150 ns were simulated.

4.4.2 | Molecular docking

AutoDock4[31] was used to dock each compound to the SphK2 active site using a Lamarckian genetic algorithm with pseudo-Solis and Wets local search.[43] The following parameters were used: the initial population of trial ligands was constituted by 200 individuals; the maximum number of generations was set to 2.7×10^4. The maximum number of energy evaluations was 25.0×10^6. For each docking job, 200 conformations were generated. All other run parameters were maintained at their default setting. The resulting docked conformations were clustered into families by considering the backbone rmsd. The lowest docking-energy conformation was considered the most favorable orientation.[44]

4.4.3 | MD simulations

The complex geometries from docking were soaked in boxes of explicit water using the TIP3P model[45] and subjected to MD simulation. All MD simulations were performed with the Amber software package[32] using periodic boundary conditions and octahedral simulation cells. The particle mesh Ewald method (PME)[46] was applied using a grid spacing of 1.2 Å, a spline interpolation order of 4 and a real space direct sum cutoff of 10 Å. The SHAKE algorithm was applied allowing for an integration time step of 2 fs. MD simulations were carried out at 310 K temperature. Three MD simulations of 50 ns were conducted for each system under different starting velocity distribution functions; thus, in total 150 ns were simulated for each complex. The NPT ensemble was employed using Berendsen coupling to a baro/thermostat (target pressure 1 atm, relaxation time 0.1 ps). Post-MD analysis was carried out with program PTRAJ.

4.4.4 | Binding energy calculations

The MM-GBSA protocol was applied to each MD trajectory in order to calculate the relative binding energies of the SphK2-ligand complexes. The MM-GBSA method was used in a hierarchical strategy, and the details of this method have been presented elsewhere.[47] This protocol was applied to 4000 equidistant snapshots extracted from the last 40.0 ns and was used within the one-trajectory approximation. Briefly, the binding free energy (ΔG_{bind}) resulting from the formation of a RL complex between a ligand (L) and a receptor (R) is calculated as follows:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (1)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{internal} + \Delta E_{electrostatic} + \Delta E_{vdW} \quad (2)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \quad (3)$$

where ΔE_{MM}, ΔG_{sol}, and $-T\Delta S$ are the changes in the gas-phase MM energy, the solvation free energy, and the conformational entropy

upon binding, respectively. ΔE_{MM} includes $\Delta E_{internal}$ (bond, angle, and dihedral energies), $\Delta E_{electrostatic}$ (electrostatic), and ΔE_{vdw} (van der Waals) energies. ΔG_{solv} is the sum of electrostatic solvation energy (polar contribution), ΔG_{PB}, and the non-electrostatic solvation component (nonpolar contribution), ΔG_{SA}. Polar contribution is calculated using the PB model, while the nonpolar energy is estimated by solvent accessible surface area.

ACKNOWLEDGMENTS

Grants from Universidad Nacional de San Luis (UNSL-Argentina) and Colombian Institute for Science and Research (Grant No. 110265842651) partially supported this work. Marcela Vettorazzi thanks a doctoral fellowship of CONICET-Argentina. This study was also partially supported by the Slovak Research and Development Agency (Grant No. APVV-0516-12) and by SANOFI-AVENTIS Pharma Slovakia. This work was also supported by grants SAF2014-57845R and SAF2017-89714-R, and the CP15/00150 from the Spanish Ministry of Economy and Competiveness, the Carlos III Institute of Health (ISCIII), and the European Regional Development Fund. Pre-doctoral grants: PM (FPI) from the Spanish Ministry of Innovation and Competitiveness.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

ORCID

Ricardo D. Enriz http://orcid.org/0000-0002-4846-9452

REFERENCES

[1] H. Liu, M. Sugiura, V. E. Nava, L. C. Edsall, K. Kono, S. Poulton, S. Milstien, T. Kohama, S. Spiegel, *J. Biol. Chem*. **2000**, *275*(26), 19513.
[2] T. Kohama, A. Olivera, L. Edsall, M. M. Nagiec, R. Dickson, S. Spiegel, *J. Biol. Chem*. **1998**, *273*, 23722.
[3] N. C. Hait, A. Maiti, *Mediators Inflamm*. **2017**, *2017*, 4806541.
[4] S. Spiegel, S. Milstien, *Nat. Rev. Immunol*. **2011**, *11*, 403.
[5] J. Tsuchida, M. Nagahashi, K. Takabe, T. Wakai, *Mediators Inflamm*. **2017**, *2017*, 2076239.
[6] S. Mohammed, K. B. Harikumar, *Front. Immunol*. **2017**, *8*, 296.
[7] T. Rohrbach, M. Maceyka, S. Spiegel, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **2017**, *52*(5), 543.
[8] K. Takabe, S. W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Pharmacol. Rev*. **2008**, *60*(2), 181.
[9] N. C. Hait, J. Allegood, M. Maceyka, G. M. Strub, K. B. Harikumar, S. K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien, S. Spiegel, *Science* **2009**, *325*(5945), 1254.
[10] D. Siow, B. Wattenberg, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **2011**, *46*(5), 365.
[11] A. S. Don, H. Rosen, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2009**, *380*(1), 87.
[12] D. Shida, K. Takabe, D. Kapitonov, S. Milstien, S. Spiegel, *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 662.
[13] P. Bouquerel, C. Gstalder, D. Müller, J. Laurent, L. Brizuela, R. A. Sabbadini, B. Malavaud, S. Pyronnet, Y. Martineau, I. Ader, O. Cuvillier, *Oncogenesis* **2016**, *5*, e209.
[14] S. S. L. Tan, L. W. Khin, L. Wong, B. Yan, C. W. Ong, A. Datta, M. Salto-Tellez, Y. Lam, C. T. Yap, *Clin. Transl. Gastroenterol*. **2014**, *5*, e51.
[15] Z. Wang, X. Min, S.-H. Xiao, S. Johnstone, W. Romanow, D. Meininger, H. Xu, J. Liu, J. Dai, S. An, S. Thibault, N. Walker, *Structure* **2013**, *21*(5), 798.
[16] M. E. Schnute, M. D. McReynolds, T. Kasten, M. Yates, G. Jerome, J. W. Rains, T. Hall, J. Chrencik, M. Kraus, C. N. Cronin, M. Saabye, M. Highkin, R. Broadus, S. Ogawa, K. Cukyne, L. Zawadzke, V. Peterkin, K. Iyanar, J. Scholten, J. Wendling, H. Fujiwara, O. Nemirovskiy, A. Wittwer, M. Nagiec, *Biochem. J*. **2012**, *444*(1), 79.
[17] V. Brinkmann, A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhye, P. Burtin, *Nat. Rev. Drug Discov*. **2010**, *9*(11), 883.
[18] S. Panneer Selvam, R. M. De Palma, J. J. Oaks, N. Oleinik, Y. K. Peterson, R. V Stahelin, E. Skordalakes, S. Ponnusamy, E. Garrett-Mayer, C. D. Smith, B. Ogretmen, *Sci. Signal*. **2015**, *8*(381), ra58.
[19] G. M. Strub, M. Paillard, J. Liang, L. Gomez, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, M. M. Price, Q. Chen, D. C. Simpson, T. Kordula, S. Milstien, E. Lesnefsky, S. Spiegel, *FASEB J*. **2011**, *25*(2), 600.
[20] E. T. Samy, C. A. Meyer, P. Caplazi, C. L. Langrish, J. M. Lora, H. Bluethmann, S. L. Peng, *J. Immunol*. **2007**, *179*(9), 5644.
[21] J. Yang, C. Yang, S. Zhang, Z. Mei, M. Shi, S. Sun, L. Shi, Z. Wang, Y. Wang, Z. Li, C. Xie, *Cancer Biol. Ther*. **2015**, *16*(8), 1194.
[22] K. G. Lim, C. Sun, R. Bittman, N. J. Pyne, S. Pyne, *Cell. Signal*. **2011**, *23*(10), 1590.
[23] K. Liu, T. L. Guo, N. C. Hait, J. Allegood, H. I. Parikh, W. Xu, G. E. Kellogg, S. Grant, S. Spiegel, S. Zhang, *PLoS ONE* **2013**, *8*(2), e56471.
[24] Y. Kharel, E. A. Morris, M. D. Congdon, S. B. Thorpe, J. L. Tomsig, W. L. Santos, K. R. Lynch, *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **2015**, *355*(1), 23.
[25] M. Vettorazzi, E. Angelina, S. Lima, T. Gonec, J. Otevrel, P. Marvanova, T. Padrtova, P. Mokry, P. Bobal, L. M. Acosta, L. Acosta, A. Palma, J. Cobo, J. Bobalova, J. Csollei, I. Malik, S. Alvarez, S. Spiegel, J. Jampilek, R. Enriz, *Eur. J. Med. Chem*. **2017**, *139*, 461.
[26] L. Stanzel, I. Malík, P. Mokrý, *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci*. **2016**, *15*(2), 235.
[27] S. Lima, S. Milstien, S. Spiegel, *J. Lipid Res*. **2014**, *55*(7), 1525.
[28] A. Sali, T. L. Blundell, *J. Mol. Biol*. **1993**, *234*(3), 779.
[29] J. Wang, S. Knapp, N. J. Pyne, S. Pyne, J. M. Elkins, *ACS Med. Chem. Lett*. **2014**, *5*(12), 1329.
[30] D. J. Gustin, Y. Li, M. L. Brown, X. Min, M. J. Schmitt, M. Wanska, X. Wang, R. Connors, S. Johnstone, M. Cardozo, A. Cheng, S. Jeffries, B. Franks, S. Li, S. Shen, M. Wong, H. Wesche, G. Xu, T. Carlson, M. Plant, K. Morgenstern, K. Rex, J. Schmitt, A. Coxon, N. Walker, F. Kayser, Z. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2013**, *23*(16), 4608.
[31] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem*. **2009**, *30*(16), 2785.
[32] D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman, *{Amber 14} OR − University of California, San Francisco* **2014**.
[33] S. Gómez Ayala, E. Stashenko, A. Palma, A. Bahsas, J. Amaro-Luis, *Synlett* **2006**, *14*, 2275.
[34] J. Tengler, I. Kapustíková, M. Peško, R. Govender, S. Keltošová, P. Mokrý, P. Kollár, J. ÓMahony, A. Coffey, K. Kráľová, J. Jampílek, *Sci. World J*. **2013**, *2013*, 274570.
[35] D. Plano, S. G. Amin, A. Sharma, *J. Med. Chem*. **2014**, *57*, 5509.
[36] U. Landmesser, B. Hornig, H. Drexler, *Circulation* **2004**, *109*(21 Suppl 1), II27.
[37] E. C. Butcher, *Cell* **1991**, *67*(6), 1033.
[38] C. Rius, C. Company, L. Piqueras, J. M. Cerda-Nicolas, C. Gonzalez, E. Servera, A. Ludwig, E. J. Morcillo, M.J. Sanz, *Thorax* **2013**, *68*(2), 177.
[39] M. Iacobini, A. Menichelli, G. Palumbo, G. Multari, B. Werner, D. Del Principe, *Biochem. Pharmacol*. **2001**, *61*(8), 1033.

[40] T. Mateo, Y. Naim Abu Nabah, M. Losada, R. Estelles, C. Company, B. Bedrina, J. M. Cerda-Nicolas, S. Poole, P. J. Jose, J. Cortijo, E. J. Morcillo, M. J. Sanz, *Blood* **2007**, *110*(6), 1895.
[41] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucl. Acids Res*. **1997**, *25*(17), 3389.
[42] S. F. Altschul, J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schaffer, Y.-K. Yu, *FEBS J*. **2005**, *272*(20), 5101.
[43] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem*. **1998**, *19*(14), 1639.
[44] T. J. A. Ewing, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem*. **1997**, *18*(9), 1175.
[45] P. Mark, L. Nilsson, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*(43), 9954.
[46] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys*. **1993**, *98*(12), 10089.
[47] P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, T. E. Cheatham, *Acc. Chem. Res*. **2000**, *33*(12), 889.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Vettorazzi M, Vila L, Lima S, et al. Synthesis and biological evaluation of sphingosine kinase 2 inhibitors with anti-inflammatory activity. *Arch Pharm Chem Life Sci*. 2019;1–14.
https://doi.org/10.1002/ardp.201800298